

10/534742

Mod. C.E. - 147

Rec'd **PCT** T/PTO 12 MAY 2005

PCT/IB03/05092

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

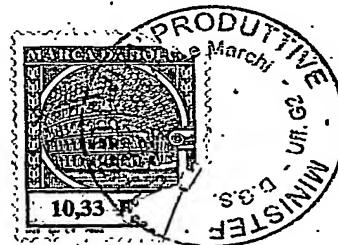
Ufficio G2

REC'D 09 JAN 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **BO2002 A 000714**



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'acchiuso processo verbale di deposito.

PCT/IB03/005092

2 DIC. 2003

Roma, II

per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano

Dr.ssa Paola Giuliano

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - BOLOGNA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

DULO A

13 NOV 2002



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione PLANTECHNO SRL (titolare 48%)
 Residenza Vicomosciano (Cremona) codice 01080070194 SR
 2) Denominazione PROGEO Scrl (titolare 35%)
 Residenza Villa Masone (Reggio Emilia) codice 00127250355 CN

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome avv. Trombetti Gioia cod. fiscale TRMGIO59P66E463E
 denominazione studio di appartenenza _____
 via Portazzia n. 8 città Bologna cap 40139 (prov) BO

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cd/scd) gruppo/sottogruppo /
 FARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE A BASSA ALLERGENICITÀ

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO SE Istanza: DATA / / N. PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) FOGHIER CORRADO
 2) _____

3)
 4) _____

F. PRIORITÀ Nazione o organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOLGIMENTO RISERVE
Data N° Protocollo

1) _____
 2) _____

/ /
 / /

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

001: I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure ex art.19 R.D. 1127/39

PLANTECHNO Srl 48%

PROGEO Scrl 35%

TECNOALIMENTI Scpa 17%

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) PROV n. pag 17 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) PROV n. tav 31 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) RIS designazione inventore
 Doc. 5) RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) RIS nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro 291,80

obbligatorio

SCIOLGIMENTO RISERVE	
Data	N° protocollo
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____
Confronta singole priorità	
<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	_____

COMPILATO IL 13 / 11 / 2002 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

avv. Trombetti Gioia, mandatario delle società richiedenti

CONTINUA (SI/NO) SIDEL PRESENTE ATTO SI RICHIENDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) NOCAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI BOLOGNA codice 37VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA BO2002A 000714 Reg. AL'anno DUEMILADUE, il giorno TREDICI del mese di NOVEMBRE 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopra riportato.ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE NESSUNA

IL DEPOSITANTE

UFFICIALE ROGANTE

Timbro dell'ufficiale

PROSPETTO A

ASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

UMERO DOMANDA

D02002A 010714

REG. A

UMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

13 NOV. 2002

DATA DI RILASCIO

/ /

RICHIEDENTE (I)

Denominazione

PLANTECHNO SRL

Residenza

Vicomoscano (Cremona)

(titolare 48%)

TITOLO

ARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE A BASSA ALLERGENICITA'

Iasse proposta (sez./cl./scl) (gruppo sottogruppo) /

RIASSUNTO

Un nuovo cereale dal cui seme si ottengono farine ad uso alimentare per la produzione di prodotti da forno ottenuti da impianti delle farine alimentari e lievitati ottenuti da impasti di tali farine.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO AGRICOLTURA

Av. Trombelli Biola mandatario

M. DISEGNO



UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

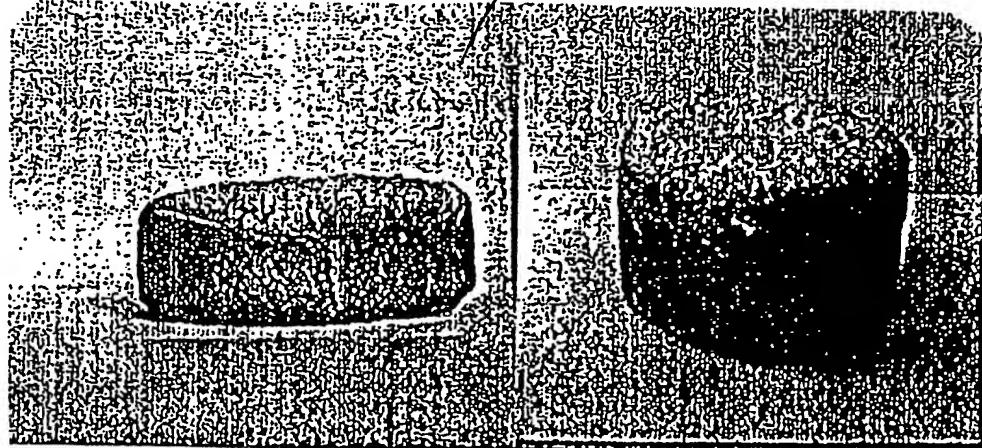


FIG. 23

DESCRIZIONE annessa alla domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo "FARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE E BASSA ALLERGENICITA'" depositata alla CCIAA di Bologna a nome delle società Plantechno Srl per il 48%, Progeo S.c.r.l per il 35% e Tecnoalimenti S.C.p.A per il 17%, a mezzo Mandatario Avvocato TROMBETTI Gioia con studio in Bologna 40139, in via Portazza 8.

Inventore Designato : FOGHER Corrado

CAMPO DELLA TECNICA

Il presente trovato si riferisce al campo della tecnica per la realizzazione di un nuovo cereale dal cui seme ottenere farine ad uso alimentare per la produzione di prodotti da forno ottenuti da impasti lievitanti delle farine alimentari ed ai lievitati ottenuti da impasti di tali farine. Come Classificazioni Internazionali di riferimento si indicano le classi: C12 n; A01 b .

STATO DELLA TECNICA

I prodotti da forno attualmente noti sono ottenuti quasi esclusivamente da farine di frumento. Tali farine infatti, per la proprietà lievitante del loro impasto con acqua e lievito, mantengono una struttura alveolare dopo la cottura in forno. Tale proprietà attribuisce alla farina di frumento, impastata opportunamente con acqua e lievito, di formare un impasto sufficientemente elastico per trattenere il gas che si produce nella fermentazione e di sviluppare una struttura soffice ed elastica dopo la cottura in forno. Responsabili di queste particolari proprietà tecnologiche sono le principali proteine di riserva dell'endosperma di frumento: le glutenine ad elevato e basso

peso molecolare. La loro particolare sequenza le rende infatti atte ad interagire per formare una complessa struttura tridimensionale capace di intrappolare l'anidride carbonica che si sviluppa nella fase di lievitazione ed assicurare al prodotto finito un volume specifico elevato.

Molte persone presentano allergie verso il glutine contenuto nelle farine di frumento, in particolare verso le componenti gliadiniche e gluteniniche a basso peso molecolare, e ciò richiede particolari attenzioni dietologiche (Sollid, 2000).

Il problema da risolvere è quello di produrre delle farine anallergiche ma lievitanti cioè atte a formare impasti impiegabili per ottenere prodotti da forno ed aventi le stesse proprietà tecnologiche degli impasti ottenuti con farine di frumento (Schuppan e Hahn, 2002).

La presente invenzione propone una soluzione ottimale a tale problema e consente di ottenere delle farine anallergiche ma lievitanti.

DESCRIZIONE

L'invenzione viene ora chiarita con riferimento, a semplice titolo di esempio non limitativo, al trasferimento nella farina di riso della capacità di generare impasti lievitanti, elastici ed atti ad ottenere un prodotto da forno con elevato volume specifico. E' noto che il riso è un cereale dal profilo nutrizionale molto particolare ed è considerato l'alimento più adatto per l'alimentazione dei bambini e degli anziani. Il riso infatti è un alimento ipoallergenizzante, altamente digeribile, con un profilo proteico non molto vario ma di elevata qualità. L'elevata digeribilità è dovuta alla piccola dimensione dei granuli di amido che risultano venti volte più piccoli di quelli di frumento e settanta volte più piccoli di quelli della patata.

Il riso è il secondo cereale dopo il frumento in termini di coltivazioni mondiali; le risaie coprono quasi centocinquanta milioni di ettari e producono ogni anno cinquecento milioni di tonnellate di riso. L'Italia in particolare è il primo produttore europeo con circa duecentomila ettari coltivati. Il riso è tra i cereali maggiori quello con il genoma più ridotto essendo sessanta volte inferiore a quello del frumento e dodici volte più piccolo di quello del mais. Il suo genoma, costituito da 12 cromosomi, è completamente sequenziato. La disponibilità della sequenza di tutti i geni di questa specie rende possibile lo studio delle sue componenti proteiche di riserva e facilita la modifica del suo corredo genetico utilizzando regioni di regolazione specifiche delle componenti di riserva del seme.

L'invenzione inoltre riguarda la costruzione di nuovi plasmidi di espressione che consentono la produzione e l'accumulo nel seme di piante quali il riso, il mais e la soia di proteine di riserva del frumento ed enzimi di origine animale. I nuovi plasmidi di espressione consentono un accumulo tessuto specifico delle proteine.

Nella presente descrizione viene riportato il lavoro di progettazione e di realizzazione del sistema di espressione in pianta, con la verifica della sua validità in una pianta quale il riso. Al fine di ottenere l'espressione seme-specifica delle proteine si sono utilizzati i promotori e le sequenze segnale appartenenti sia ai geni di frumento che ai geni di proteine di riserva del riso.

Queste sequenze di regolazione e strutturali sono state isolate e clonate dalle varietà di frumento Cheienne, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Il gene per la proteina animale transglutaminasi è stato clonato a partire da cDNA di tessuto di fegato di criceto. Tutte le componenti geniche clonate sono state controllate a livello di sequenza. Le sequenze clonate sono state utilizzate tal



quali o dopo mutagenesi per eliminare eventuali epitopi riconosciuti come attivatori della risposta immunitaria nei pazienti con allergia al glutine. I costrutti finali utilizzati per la trasformazione del riso, ma utilizzabili anche in altri cereali e nelle leguminose, sono stati realizzati in vettori del tipo pUC 19 e con questi si sono trasformati embrioni immaturi di riso varietà Ariete e Rosa Marchetti mediante cotrasformazione dei costrutti con metodi fisici. Per ogni esperimento di trasformazione, realizzato utilizzando fino a 10 costrutti in varie combinazioni, si sono selezionate circa 100 piante transgeniche (T₀) igromicina resistenti e queste controllate a livello molecolare con tecniche PCR. L'eventuale ulteriore combinazione di geni di interesse in una unica linea transgenica è stata realizzata mediante incrocio seguito da diploidizzazione di linee aploidi, rigenerate da coltura di antere, per raggiungere prima lo stato di omozigosi di ogni singolo transgene presente. Il controllo della specificità di accumulo delle varie proteine nel seme è stato eseguito con tecniche dot blot e Western utilizzando anticorpi polyclonali sviluppati contro le proteine prodotte in *E. coli*.

Dunque l'invenzione rende disponibili: (1) nuove varietà di riso differenziate dalla capacità di accumulo di diverse proteine di riserva di frumento e di un enzima animale in grado di favorire la formazione di legami intercatena tra le proteine stesse; (2) nuovi vettori plasmidici costruiti per la produzione di proteine di riserva del frumento in altri cereali; (3) una farina di riso con caratteristiche tecnologiche simili a quelle delle farine di frumento.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende i seguenti componenti funzionalmente legati da 5' a 3' a formare un vettore di espressione plasmidiale: (a) un promotore; (b) una sequenza nucleotidica corrispondente alla sequenza aminoacidica delle glutenine di frumento aventi una

certa sequenza c-terminale, oppure alla transglutaminasi di criceto; (c) un segnale di poliadenilazione.

Le sequenze di DNA da (a) a (c) sono clonate in vettori diversi a formare plasmidi. I plasmidi di espressione risultanti possono essere utilizzati per la trasformazione di cellule vegetali con metodi fisici diretti. Le cellule vegetali trasformate sono selezionate e indotte a formare piante intere fertili in grado di formare semi e questi di esprimere i geni delle proteine di riserva o enzimatica.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende sequenze nucleotidiche di glutenine di frumento modificate, con tecniche di mutagenesi diretta, per eliminare sequenze aminoacidiche riconosciute come allergeniche nelle allergie alimentari al glutine.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende l'uso di farine ricavate da seme di piante trasformate con i plasmidi sopra menzionati, per la produzione di prodotti da forno, previo impasto e fermentazione.

Breve descrizione delle tabelle e figure

Le caratteristiche, le inclusioni e gli obiettivi dell'invenzione, brevemente richiamati in precedenza, diventeranno più chiari e comprensibili considerando le didascalie delle tabelle e figure che seguono. Si fa notare però che gli esempi in figura illustrano inclusioni preferenziali dell'invenzione e perciò non si intendono limitative degli scopi.

Tabella 1. Mostra alcune delle sequenze aminoacidiche delle proteine di frumento scelte per l'espressione in riso e il motivo c-terminale LKVAKAQQLAAQLPAMCR conservato (posizione 945-962).

Tabella 2. Mostra la sequenza nucleotidica del gene per l'enzima transglutaminasi di criceto.

Tabella 3. Mostra una delle sequenze nucleotidiche della regione di regolazione di riso utilizzate per l'espressione seme specifica dei geni di frumento e criceto.

Tabella 4. Riporta la sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per il clonaggio dei geni di alcune delle proteine di riserva di frumento e dell'enzima transglutaminasi di criceto.

Tabella 5. Riporta il risultato di un test ELISA eseguito su farina di frumento, farina di riso e nuova farina della linea PLT3000R13-7.

Figura 1. Riporta il plasmide pIGP 2001 ottenuto dal clonaggio del gene 1Bx7 di frumento.

Figura 2. Riporta il plasmide pIGP 2002 ottenuto dal clonaggio del gene 1By9 di frumento.

Figura 3. Riporta il plasmide pIGP 2003 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dx5 di frumento.

Figura 4. Riporta il plasmide pIGP 2004 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dy10 di frumento.

Figura 5. Riporta il plasmide pIGP 2005 ottenuto dal clonaggio del gene 1Ax2 di frumento.

Figura 6. Riporta il plasmide pPLT 2006 ottenuto dal clonaggio del gene 1Bx17 di frumento.

Figura 7. Riporta il plasmide pIGP 2008 ottenuto dal clonaggio del gene GluHMW2 di frumento.

Figura 8. Riporta il plasmide pIGP 2009 ottenuto dal clonaggio del gene Glu1A di frumento.

Figura 9. Riporta il plasmide pIGP 2010 ottenuto dal clonaggio del gene 1Ax1 di frumento.

Figura 10. Riporta il plasmide pIGP 2012 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dy12 di frumento.

Figura 11. Riporta il plasmide pIGP 2050 ottenuto dal clonaggio della variante MUT1 del gene 1Dy10 di frumento.

Figura 12. Riporta il plasmide pIGP 2051 ottenuto dal clonaggio della variante MUT1 del gene 1By9 di frumento.

Figura 13. Riporta il plasmide pIGP 2052 ottenuto dal clonaggio della variante MUT3 del gene 1By9 di frumento.

Figura 14. Riporta il plasmide pIGP 2100 ottenuto dal clonaggio del gene che codifica per la transglutaminasi (TG) di criceto.

Figura 15. Come esempio si riporta un gel di agarosio con il DNA risultante dalla amplificazione mediante PCR, eseguita utilizzando primer specifici per singoli geni di frumento, su DNA estratto da piante di riso T_0 trasformate con i plasmidi delle figure 1-14.

Figura 16. Come esempio si riportano i risultati dell'analisi Southern eseguita su alcune piante T_1 della figura 15, trasformate con i plasmidi delle figure 1-14.

Figura 17. Come esempio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da semi delle piante transgeniche T_2 indicate e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando anticorpi policlonali specifici per la proteina di riserva di frumento 1By9.

Figura 18. Come esempio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da semi delle piante transgeniche indicate e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando un anticorpo policlonale specifico per la transglutaminasi (TG) di criceto.

Figura 19. Come esempio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da linee transgeniche di riso trasformate con il gene per la proteina 1Dy10 e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando un anticorpo policlonale specifico.

Figura 20. Come esempio si riporta una elettroforesi monodimensionale delle proteine di riserva di alcune varietà di frumento con evidenziate le bande corrispondenti ai geni clonati.

Figura 21. Come esempio si riporta una elettroforesi monodimensionale delle proteine di riserva di frumento dove sono visibili le due classi di glutenine ad elevato e basso peso molecolare.

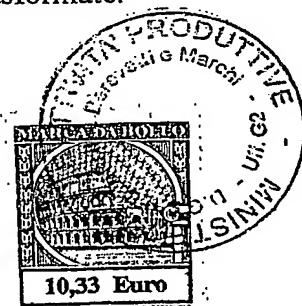
Figura 22. Come esempio si riporta il risultato di una analisi Western eseguita sulle proteine della figura 21, dopo trasferimento su membrana, utilizzando il siero di un paziente con allergia al glutine, per evidenziare il riconoscimento quasi esclusivo delle glutenine a basso peso molecolare.

Figura 23. Come esempio si riporta il risultato di una prova di panificazione eseguita utilizzando, nell'impasto, la farina prodotta da una linea transgenica di riso (destra) che esprime le proteine di frumento 1Ax1, 1Dx2, 1Dx5, 1Bx6, 1Bx7, 1Bx17, MUT11Dx10, MUT11By9 e l'enzima TG a confronto con una farina di riso normale (sinistra).

Figura 24. Come esempio si riporta, in sezione, il risultato della prova descritta in figura 23 per mostrare l'alveolatura e la lievitazione ottenuta con la nuova farina a confronto con una farina di riso.

Figura 25. Come esempio si riporta l'alveogramma ottenuto con la nuova farina ricavata dal seme della linea riportata in figura 23.

Figura 26. Come esempio la figura riporta il risultato di una analisi PCR per dimostrare la presenza del gene per l'enzima transglutaminasi nelle linee trasformate.



Descrizione dettagliata dell'invenzione

Per il clonaggio delle sequenze corrispondenti ai geni delle glutenine ad elevato peso molecolare, di frumento, con o senza la regione di regolazione, è stata utilizzata la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) a partire dalle informazioni di sequenza presenti in banca dati. In questo caso si è utilizzato DNA genomico estratto da foglie di *Triticum aestivum* delle cultivar Cheienne, Chiarano, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Alcuni degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione specifica sono riportati in tabella 4.

Per il clonaggio della sequenza corrispondente al gene di criceto che codifica per l'enzima transglutaminasi è stata utilizzata la tecnica RT-PCR. In questo caso si è utilizzato RNA totale estratto da fegato di criceto e gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono riportati in tabella 4. Una volta clonati i geni che codificano per le proteine di frumento sono stati utilizzati tal quali oppure sottoposti a cicli di mutagenesi sito diretta per sostituire specifici aminoacidi. In particolare le sequenze nucleotidiche modificate codificano per le sequenze aminoacidiche del tipo, a solo titolo di esempio non limitativo, PFPQPQLPY, PQPQLPYPYQ, PYPQPQLPY, LQLQPFPQPQLPY, QQGYYPTSPQQSG, QQGYYPTSTS, PFSQQQQQ, QSEQSQQPFQPQ e QXPQQPQQF ponendo particolare attenzione alla sostituzione delle glutamine e degli altri aminoacidi nelle posizioni sottolineate (Willemun et al., 2002; Shan et al., 2002).

Per il promotore PROL di riso si è partiti da informazioni di sequenza ricavate da esperimenti di differential display che evidenziavano la specificità d'espressione nel seme del clone originale.

A seguito del confronto di sequenza in banca dati il clone è risultato corrispondere al 100% alla

sequenza con Acc. Number AF156714 e da questa si è partiti per il clonaggio con tecnica PCR dal DNA genomico della varietà Ariete.

Nel caso del frumento i prodotti dell'amplificazione corrispondono alle dimensioni attese per i singoli geni in base ai dati di sequenza EMBL. Nel caso del promotore di riso il DNA stampo è stato estratto da foglie di *Oryza sativa* varietà Ariete e il prodotto di amplificazione corrisponde alle dimensioni attese in base ai dati di sequenza EMBL.

A partire dai frammenti amplificati, mediante ligazione nel vettore pGEM-T, si sono costruiti i vettori da cui i singoli frammenti sono stati recuperati, utilizzando gli enzimi indicati, per inserirli nel vettore pPLT 100 (derivato da pUC19) ed ottenere i costrutti finali riportati nelle figure 1-14. I plasmidi ottenuti sono stati controllati mediante analisi di restrizione con diversi enzimi e un clone per tipo è stato scelto e sequenziato. I cloni sequenziati si sono rilevati identici alle sequenze presenti in banca dati, con l'eccezione della sequenza del promotore PROL che presentava alcune differenze nucleotidiche con la sequenza depositata. I plasmidi pIGP2001, pIGP2002, pIGP2003, pIGP2004, pIGP2005, pPLT2006, pIGP2008, pIGP2009, pIGP2010, pIGP2012, pIGP2050, pIGP2051, pIGP2052, pIGP2100 e pIGP2500 (che porta il gene di resistenza all'igromicina, utilizzata per la selezione dei trasformati) sono stati purificati da colture cellulari di *E. coli* e il DNA utilizzato per la trasformazione degli embrioni di riso con tecnica biolistica.

Le piante T₀ sono state controllate mediante PCR (figura 15), le T₁ mediante analisi Southern (figura 16) e le T₂ e generazioni successive, mediante analisi Western (figure 17, 18 e 19). Le piante positive alla PCR portavano tutte all'accumulo della proteina corrispondente, riconosciuta

dagli anticorpi specifici, solo nel seme. La presenza della proteina ricombinante solo nel seme e non nelle foglie è stata verificata in tutte le piante transgeniche esaminate.

Esempio 1: Clonaggio dei geni che codificano per le proteine di frumento.

I geni di interesse sono stati clonati a partire da DNA genomico di frumento estratto da singole varietà conosciute per avere una buona espressione della proteina di interesse. Si sono utilizzate principalmente le varietà di frumento tenero Cheienne, Chiarano, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Il DNA genomico è stato utilizzato come templato in reazioni di PCR che si sono dovute ottimizzare per ogni singolo gene (Mullis e Falloona, 1987). Come esempio di seguito si riportano le condizioni utilizzate per l'amplificazione del gene Ax1: denaturazione iniziale a 98°C per 3 min, seguita da 38 cicli con denaturazione a 95°C per 1 min, annealing a 62°C per 1 min, estensione a 72°C per 4 minuti, seguita da una sintesi finale a 72°C per 10 min. I primer utilizzati sono stati disegnati, per ogni singolo gene (tabella 4), considerando sia la parte strutturale da sola, a partire dall'ATG fino al codone di stop, sia la parte strutturale più la regione di regolazione in 5' e in 3'.

I frammenti amplificati sono stati clonati nel vettore pGEM-T (Promega), sequenziati e subclonati sia in vettori per l'espressione in *E. coli* (pET 28) per produrre la proteina da utilizzare nell'immunizzazione dei conigli, sia in vettori di espressione specifici per riso (pPLT 100). Nei casi in cui i geni sono stati modificati questi sono stati sottoposti a cicli di mutagenesi eseguita nel vettore pGEM, seguita da un ulteriore sequenziamento per la verifica delle variazioni introdotte nei codoni.

Esempio 2: Trasformazione genetica di embrioni di riso.



A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized 'A' or a similar character.

Le piante delle varietà di riso Ariete e Rosa Marchetti, scelte per l'esecuzione della trasformazione genetica, sono state seminate in serra a marzo. All'epoca della fioritura le singole spighe sono state cartellinate indicando la data esatta di fioritura e dopo 11 giorni gli embrioni immaturi sono stati excisi dal seme, in condizioni sterili, per la trasformazione genetica con metodi fisici, utilizzando lo strumento PDS-1000/He (BioRad). La modifica genetica è stata eseguita utilizzando una tecnica di co-trasformazione in cui il marcitore di selezione (resistenza all'igromicina) era presente su un plasmide separato (pIGP 2500) da quelli contenenti i geni di interesse (pIGP 2001-2100).

Negli esperimenti di trasformazione la concentrazione totale di DNA era di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, utilizzando 0,6 μg di DNA per ogni bombardamento del tessuto bersaglio. Il rapporto tra DNA con il marcitore di selezione e DNA con il gene o i geni di interesse era 1:5 (calcolato sul numero di molecole). Quando la trasformazione comprendeva più geni di interesse il rapporto rimaneva costante tra plasmide di selezione e il plasmide con il gene di interesse (1:5), mentre i geni di interesse tra di loro rimanevano nel rapporto 1:1 (es. per 6 geni il rapporto molare finale era di 1:5:5:5:5:5). La trasformazione è stata realizzata trasferendo sia il plasmide marker in combinazione con un solo plasmide con il gene di interesse, sia con diversi (fino a 10) plasmidi con i geni di interesse (Chen et al., 1998). Nel caso di trasformazione con uno o pochi geni di interesse, o quando l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di solo alcuni dei geni introdotti, le linee transgeniche ottenute sono state incrociate tra di loro per riunire in una unica linea i diversi geni. Le singole piante segreganti che presentavano i geni di interesse sono state diploidizzate a partire da aploidi ottenuti dalla coltura di antere, per garantire l'omozigosi dei



singoli geni. Gli espianti bersaglio, approssimativamente 30 embrioni immaturi, venivano raggruppati al centro di una capsula Petri, 6 giorni dopo il prelievo, contenente il terreno osmotico NB con 0,4 M mannitol. Dopo incubazione per 4 ore gli embrioni venivano bombardati, utilizzando particelle d'oro, diametro 1,5-3,0 micron, per 2 volte alla pressione di 1100 psi e 27 inches di vuoto di Hg. Ventiquattro ore dopo il bombardamento gli embrioni venivano trasferiti singolarmente in terreno NB ed incubati per 3 giorni a 28°C al buio e poi trasferiti su terreno solido di selezione contenente 50 mg/litro di igromicina B. Dopo 2 settimane di selezione gli embrioni venivano trasferiti in un terreno di selezione liquido R2 (Ohira et al. 1973) supplementato con 1 mg/l di 2,4-D, 1 mg/l tiamina, 30 g/l saccarosio e 50 mg/l igromicina B. Gli embrioni venivano mantenuti a 90 rpm su una piastra rotante per altre 2 settimane, cambiando il terreno a metà periodo. Quando i calli resistenti alla igromicina diventavano visibili venivano trasferiti in un terreno per aumentare la massa di callo (R21) e poi al terreno di rigenerazione (MS), contenente 2,5 mg/l BAP e 0,5 mg/l NAA, alla luce con fotoperiodo di 16 ore. Gli apici rigenerati venivano poi trasferiti in terreno di radicazione per 4 settimane e poi nei vasi in serra.

Esempio 3: Produzione di un impasto

La produzione dell'impasto è stata eseguita seguendo una identica procedura per la farina di frumento (var. Veronese), la farina di riso (var. Rosa Marchetti) e la nuova farina (linea PLT300R13-7). 500 gr di farina sono stati impastati con 350 ml di acqua, 10 gr di sale, 10 gr di zucchero e 7 gr di lievito secco attivo. L'impasto è stato ottenuto utilizzando un autobakeri e

lavorando la miscela per un tempo di 10 minuti. L'impasto è stato mantenuto in lievitazione per 1 ora a 37°C, seguito dalla cottura a 200°C per 60 minuti.

Bibliografia: Chen L., et al. 1998. *Nature Biotechnology* 16:1060. Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. *Method. Enzymol.* 155:335. Ohira K., Ojima K., Fijiwara A. 1973. *Plant Cell Physiol.* 14:1113. Sanford J.C., Smith F.D., Russel J.A. 1993. *Meth. Enzymol.* 317:483. Schuppan D., Hahn E.G. 2002. *Science* 297:2218. Shan L. et al. 2002. *Science* 297:2275. Sollid L.M. 2000. *Annu. Rev. Immunol.* 18:53. Willemun V., et al. 2002. *Gastroenterology* 122:1729.

R I V E N D I C A Z I O N I

1. Una farina ad uso alimentare con specifiche caratteristiche tecnologiche quali la capacità di lievitare e caratteristiche alimentari quali bassa allergenicità;
2. Una farina come al punto 1 derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma uno o più geni che codificano per proteine di riserva del frumento;
3. Una farina derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma un gene che codifica per l'enzima transglutaminasi;
4. Una farina derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma diverse combinazioni dei geni indicati nelle rivendicazioni 2 e 3;
5. Una farina derivata dal seme di una pianta di riso modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;
6. Una farina derivata dal seme di una pianta di mais modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;



7. Una farina derivata dal seme di una pianta di soia modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;
8. Una sequenza nucleotidica che codifica per la sequenza aminoacidica LKVAKAQQLAAQLPAMCR presente nella parte C-terminale di una classe delle proteine di riserva di frumento;
9. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento;
10. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta, per esempio di riso; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento contenente la sequenza aminoacidica del punto 8;
11. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento modificata mediante tecniche di ingegneria proteica per eliminare specifici epitopi;
12. Un plasmide ricombinante secondo le rivendicazioni 9 e 11 e dove la sequenza di regolazione della cassetta di espressione proviene dal gene corrispondente alla proteina di riserva di frumento;
13. Un plasmide ricombinante secondo la rivendicazione 9 e dove la sequenza di regolazione della cassetta di espressione proviene dal gene corrispondente ad una proteina di riserva di un cereale o di una leguminosa;
14. Un plasmide ricombinante secondo la rivendicazione 9 dove la sequenza strutturale corrisponde alla proteina enzimatica transglutaminasi;

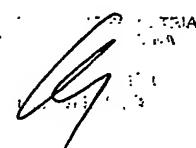
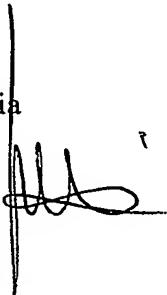


15. Cellule vegetali trasformate con il DNA di una delle rivendicazioni da 9 a 14;
16. Cellule vegetali trasformate con il DNA di due o più delle rivendicazioni da 9 a 14 in diverse combinazioni;
17. Piante trasformate esprimenti i geni presenti nei plasmidi delle rivendicazioni da 9 a 14;
18. Piante trasformate esprimenti i geni presenti in due o più dei plasmidi delle rivendicazioni da 9 a 14;
19. La produzione di farine a partire dal seme delle piante delle rivendicazioni da 2 a 7, ottenute con tecniche molitorie specifiche;
20. La produzione di prodotti da forno ottenuti a partire da farine o concentrati proteici della rivendicazione 19;
21. La produzione dell'enzima transglutaminasi partendo da farine derivate dal seme delle piante della rivendicazione 3, 4, 5, 6 e 7.

PER INCARICO DELLE SOCIETA' RICHIEDENTI

IL MANDATARIO

AVVOCATO TROMBETTI Gioia



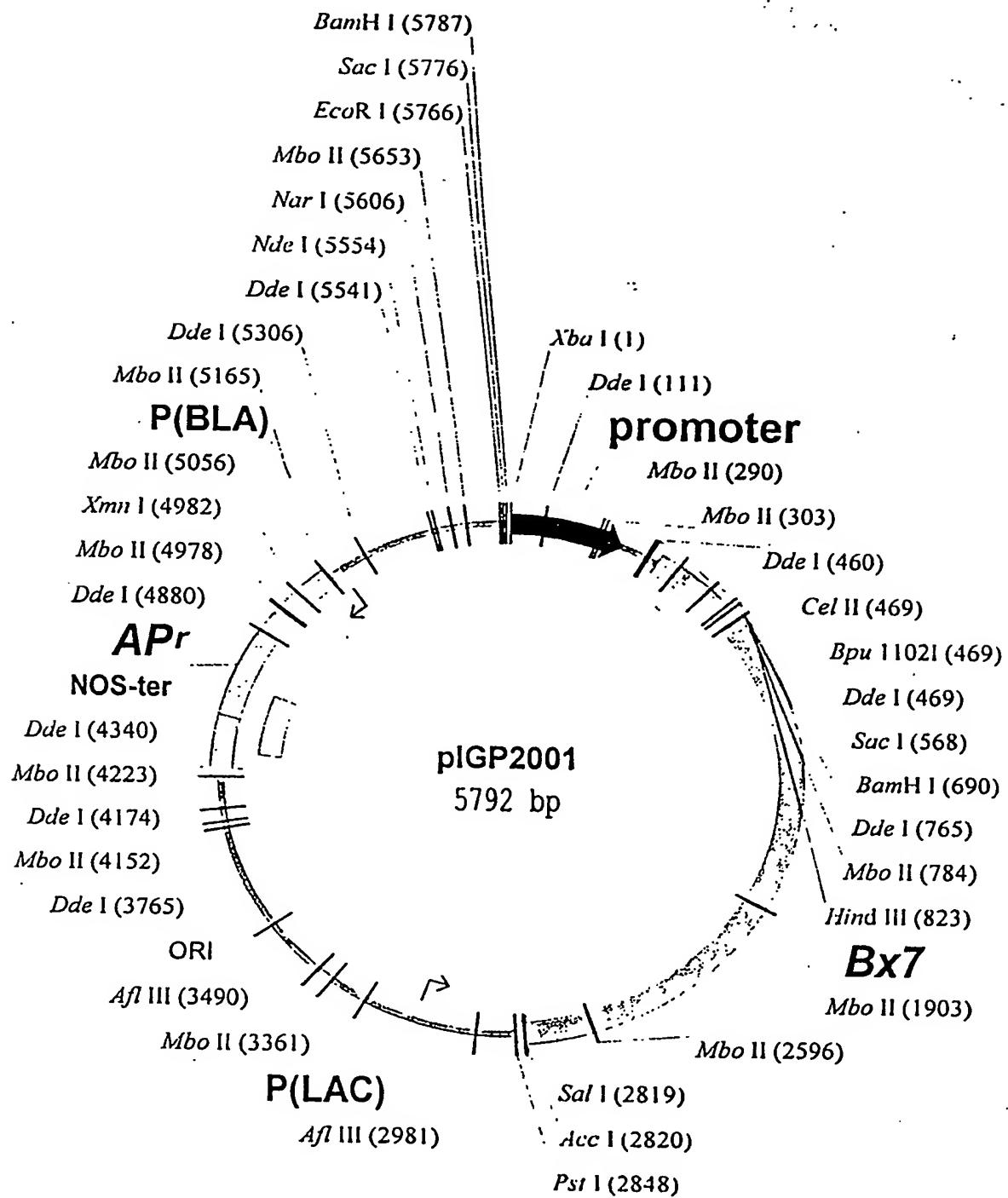
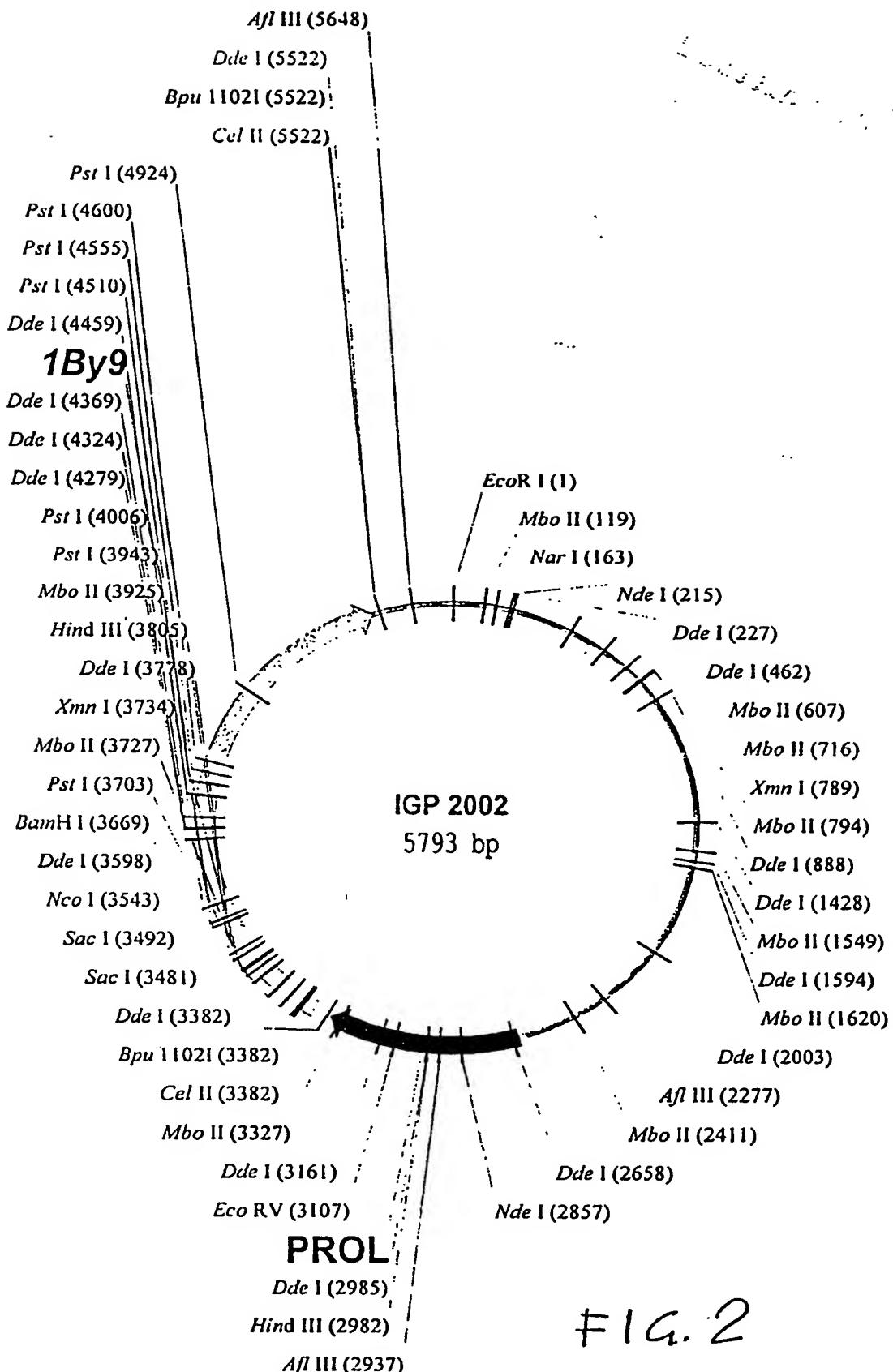


FIG. 1



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
 ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
 DI BOLOGNA
 UFFICIO BREVETTI
 IL FUNZIONARIO



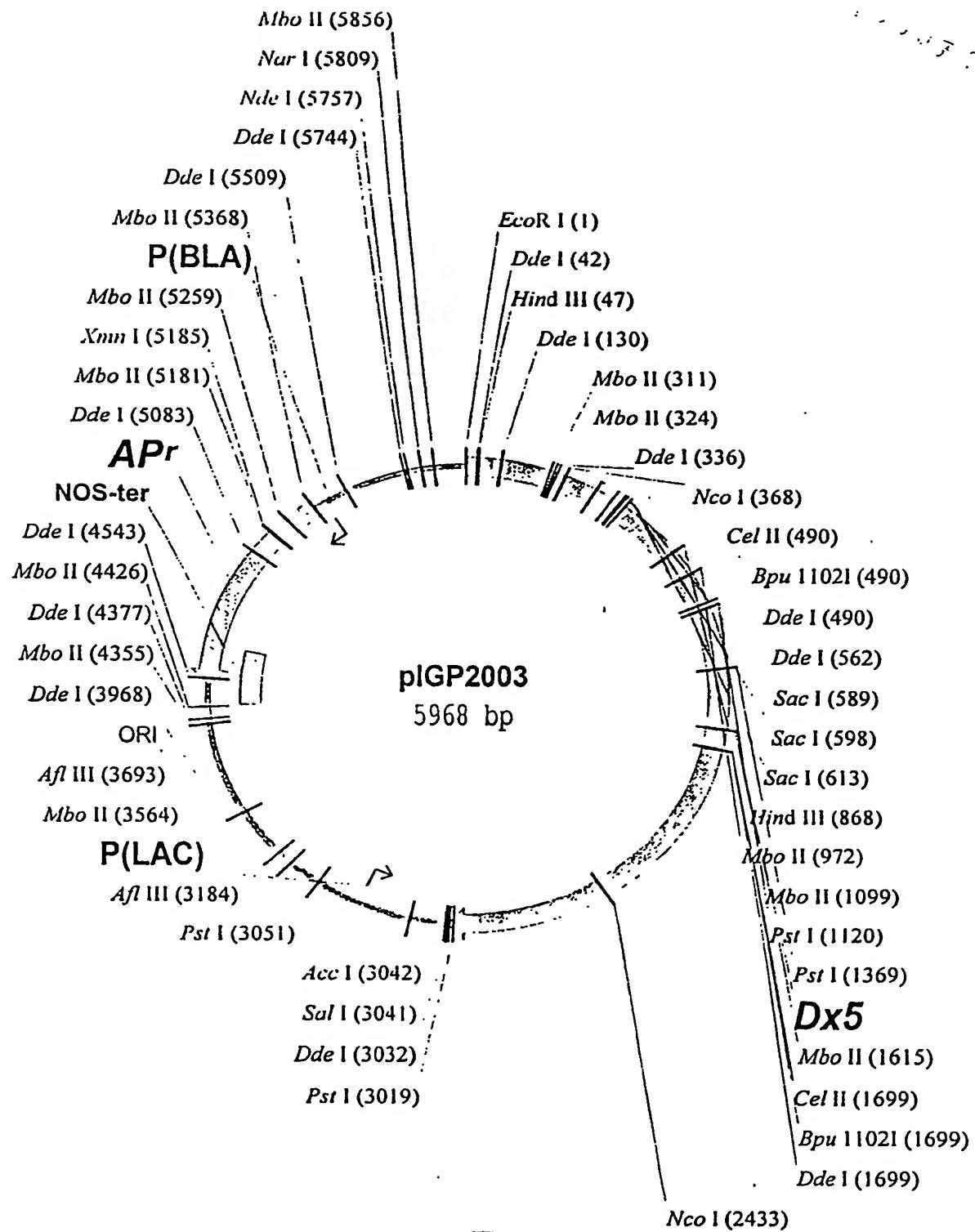


FIG. 3



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGLIERIA E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

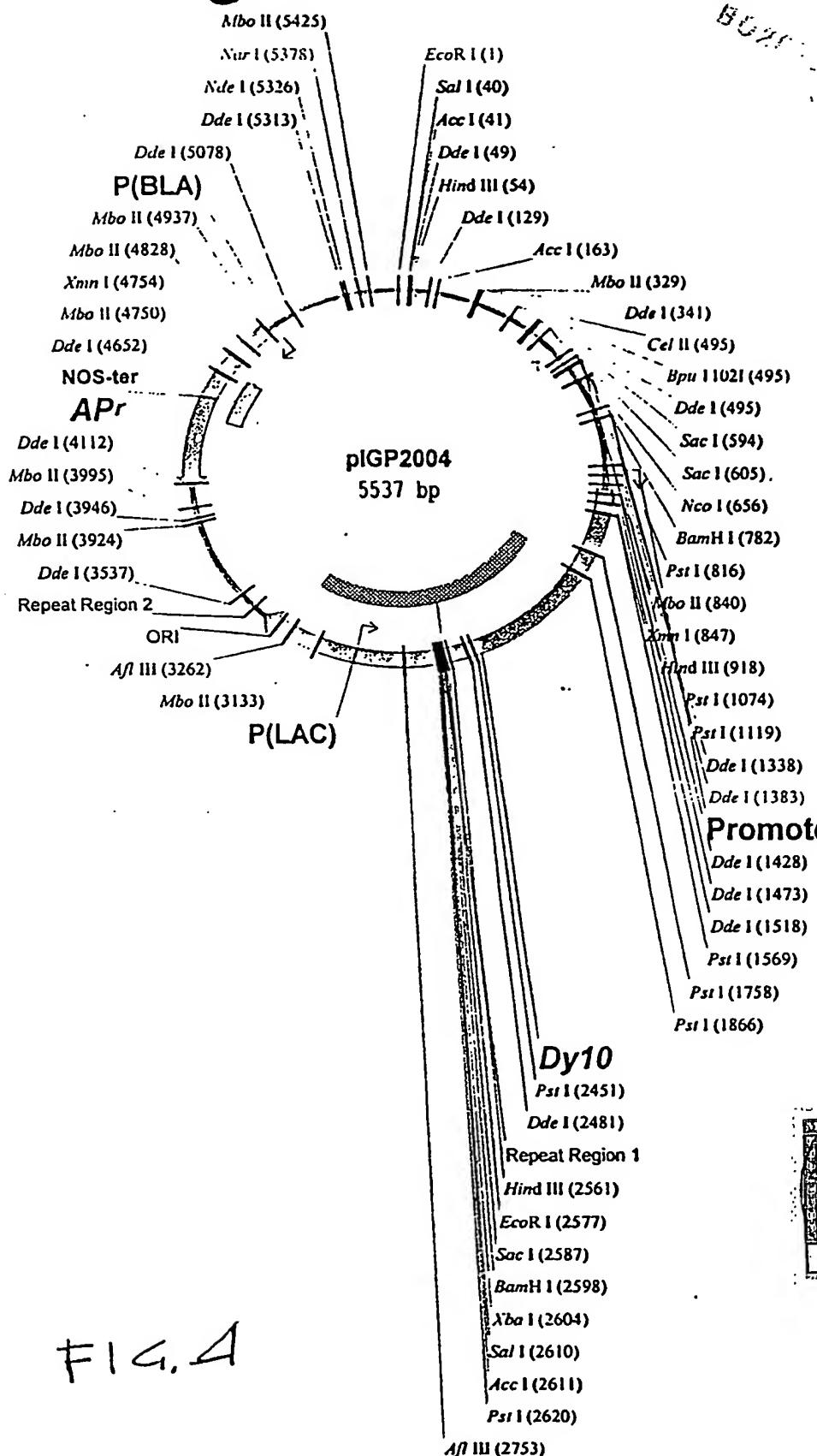
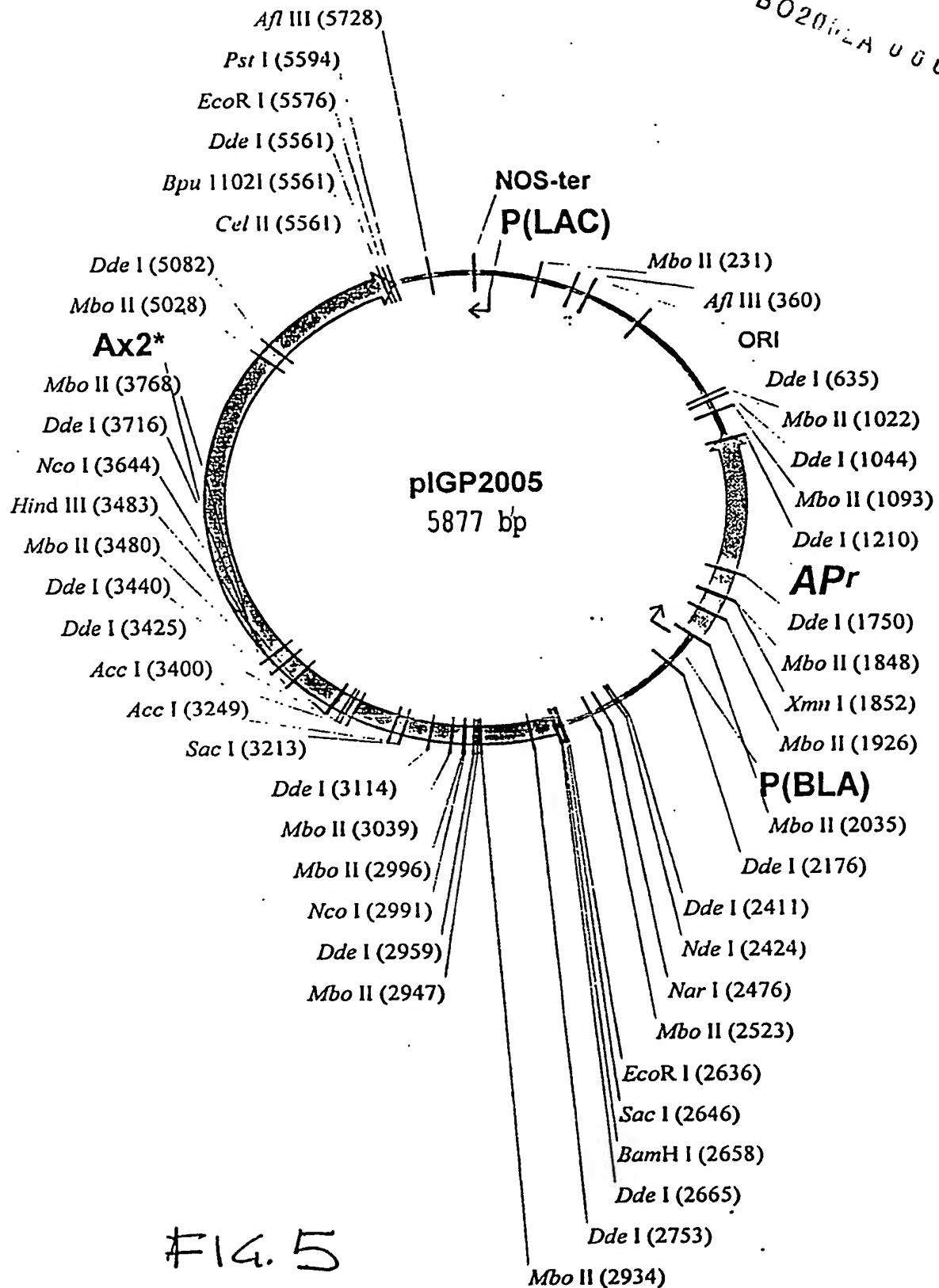


FIG. 4





CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO AGRICOLTURA
DI POLESINE
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

BO2002A 000714

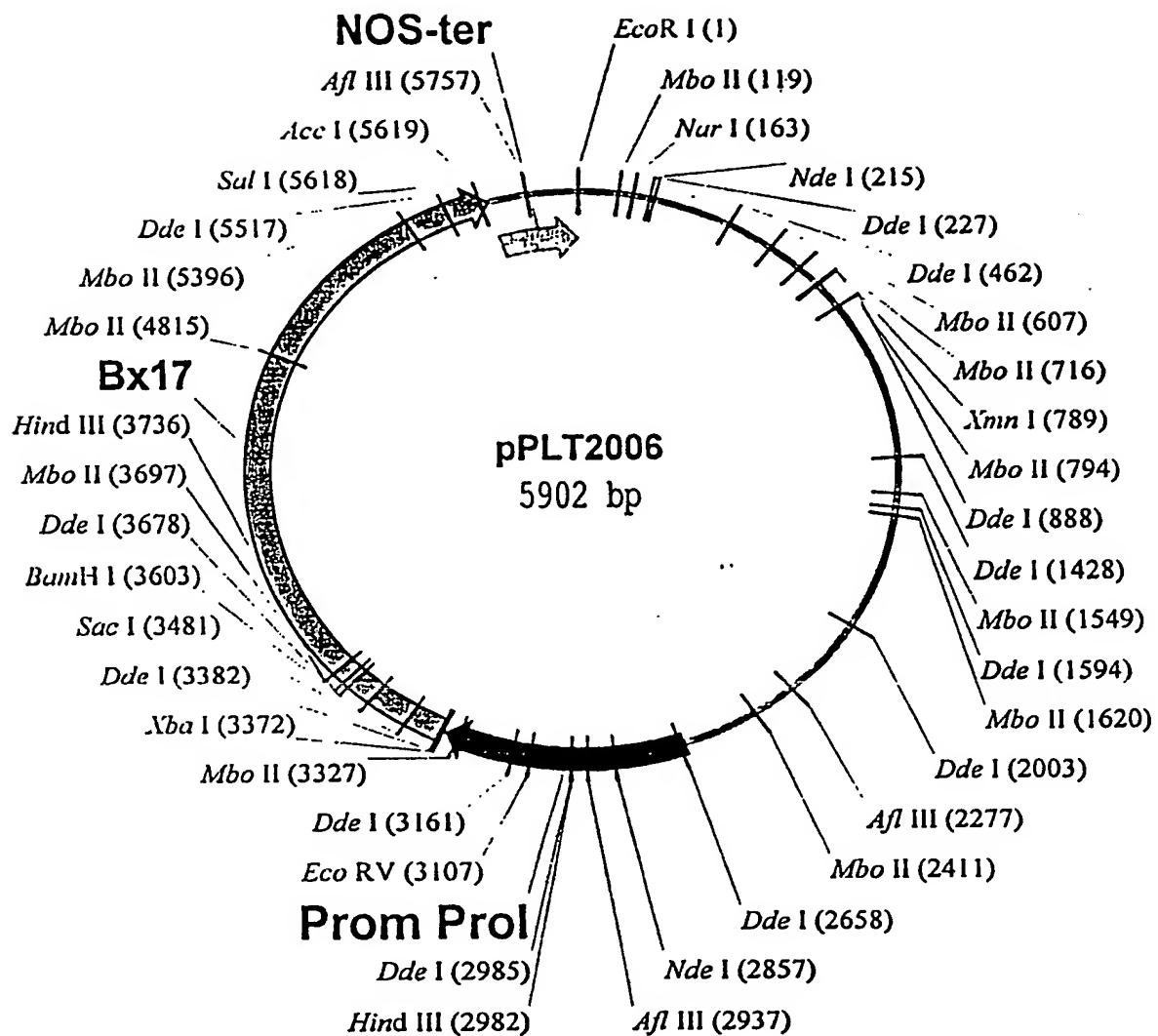


FIG. 6



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONAMENTO

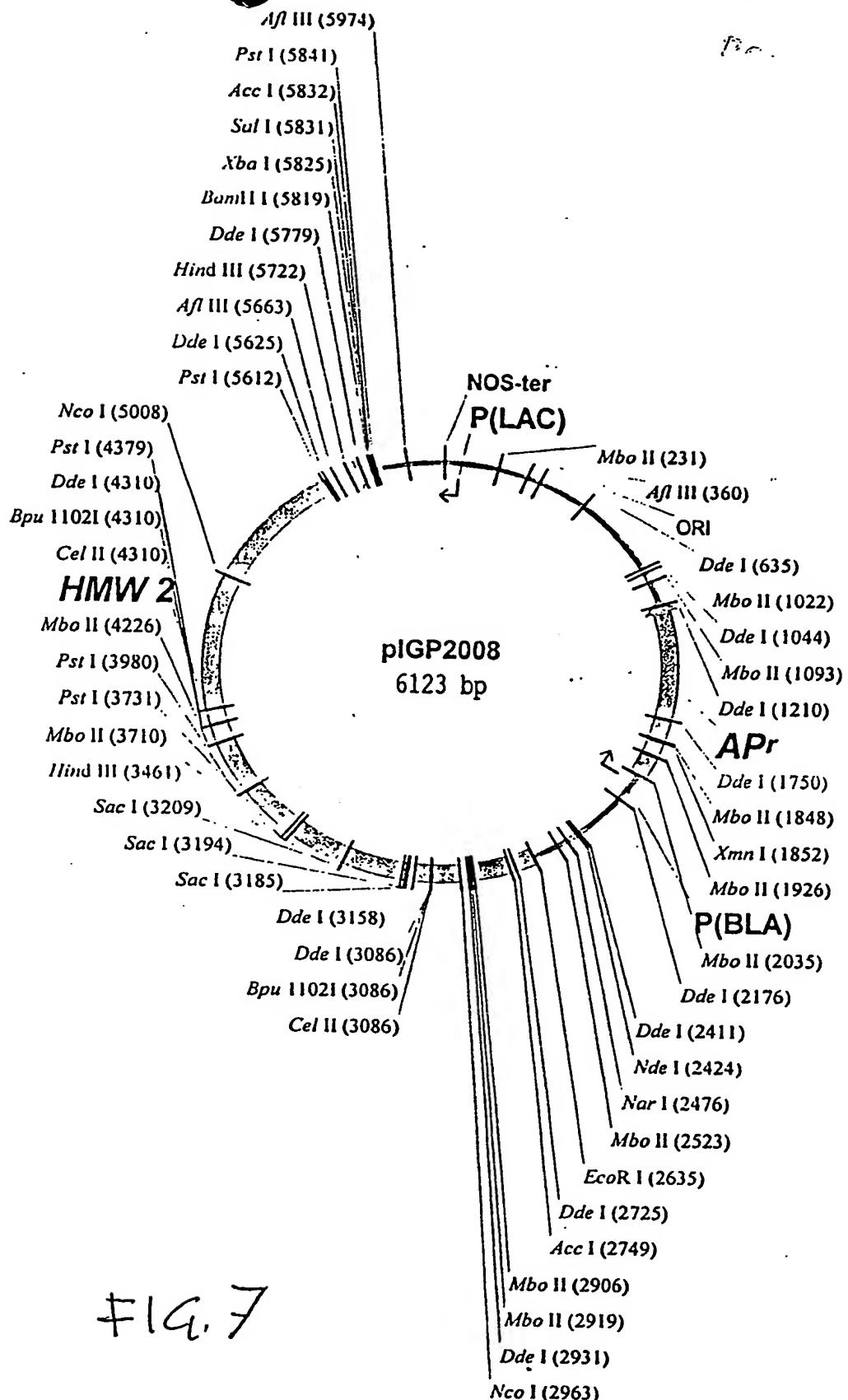


FIG. 7



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

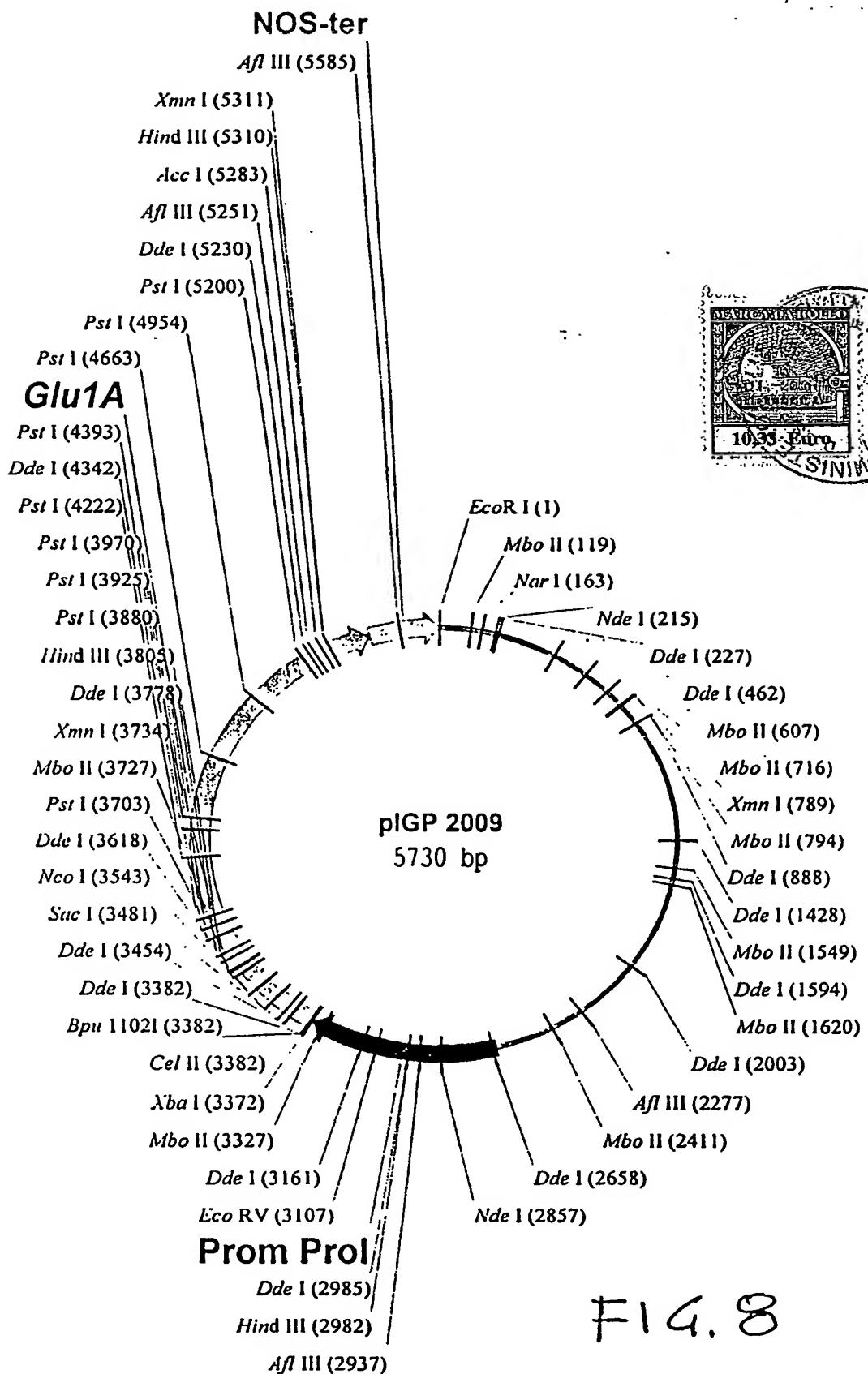
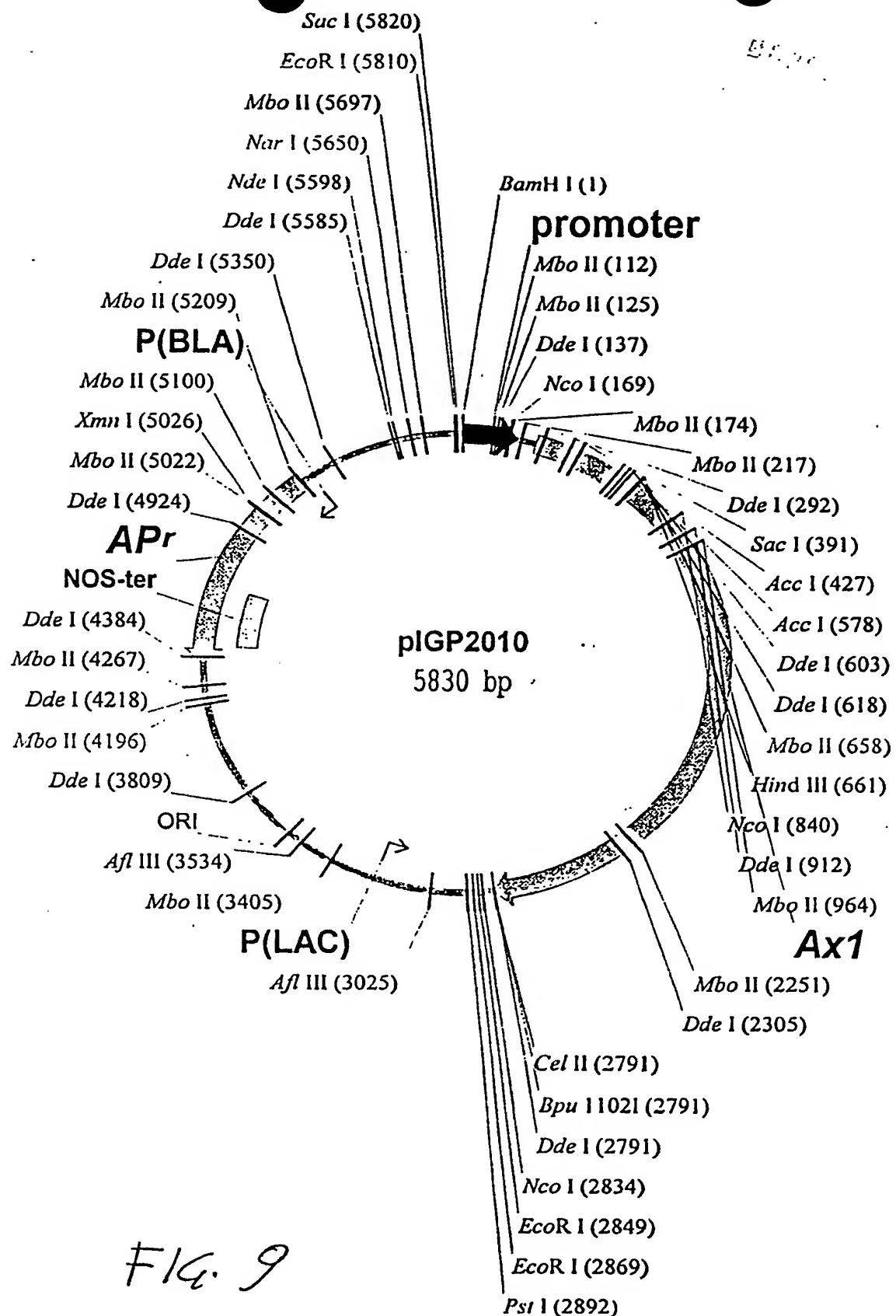


FIG. 8



CAFFÈ DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO



CAFFÈ DI COMMERCIO INDUSTRIA
MINISTERO DELL'AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

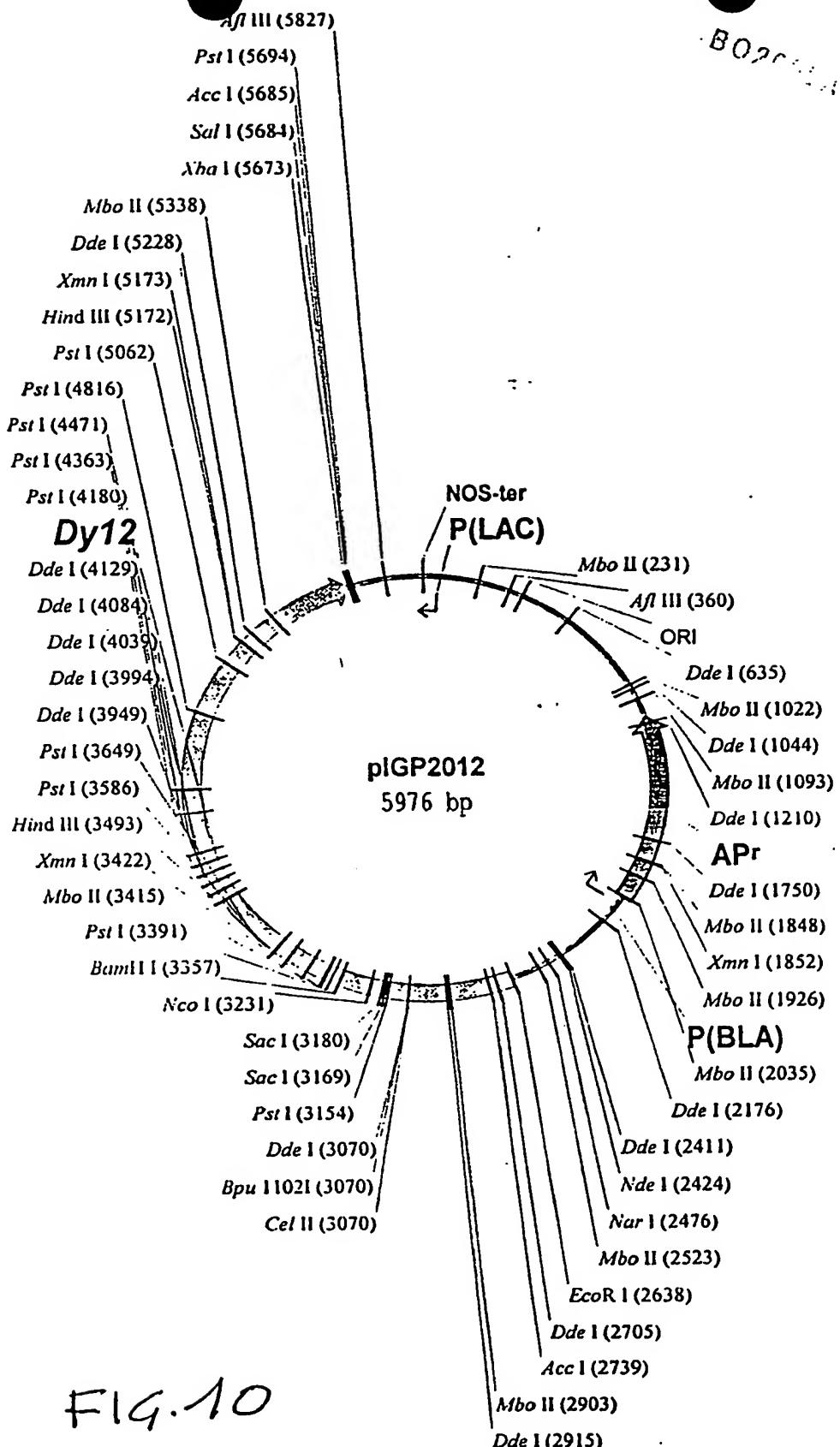


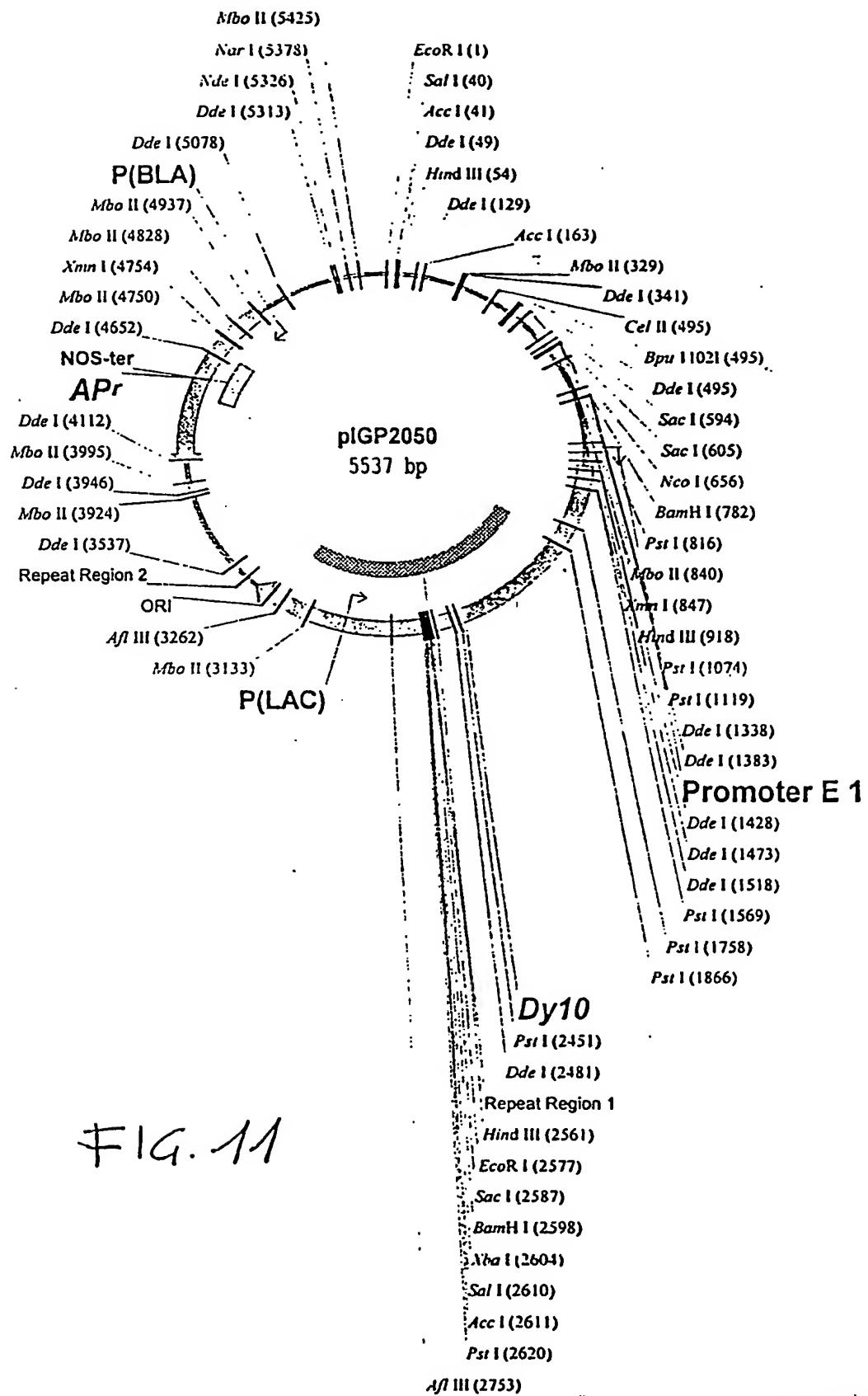
FIG. 10



AGENZIA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ANTICO E NUOVO SISTEMA AGRICOLO-FORNA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO



B02002A 000714



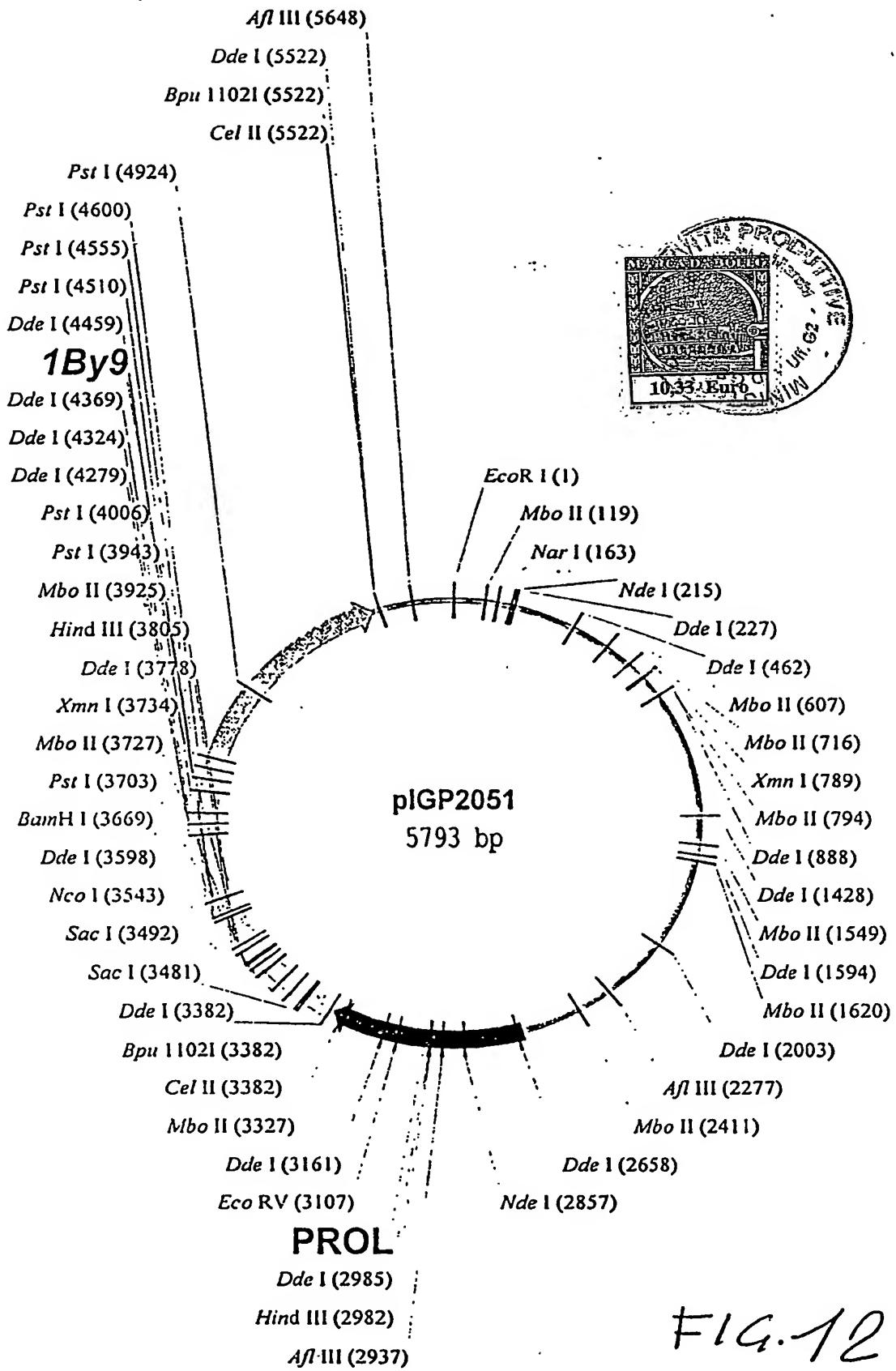


FIG. 12

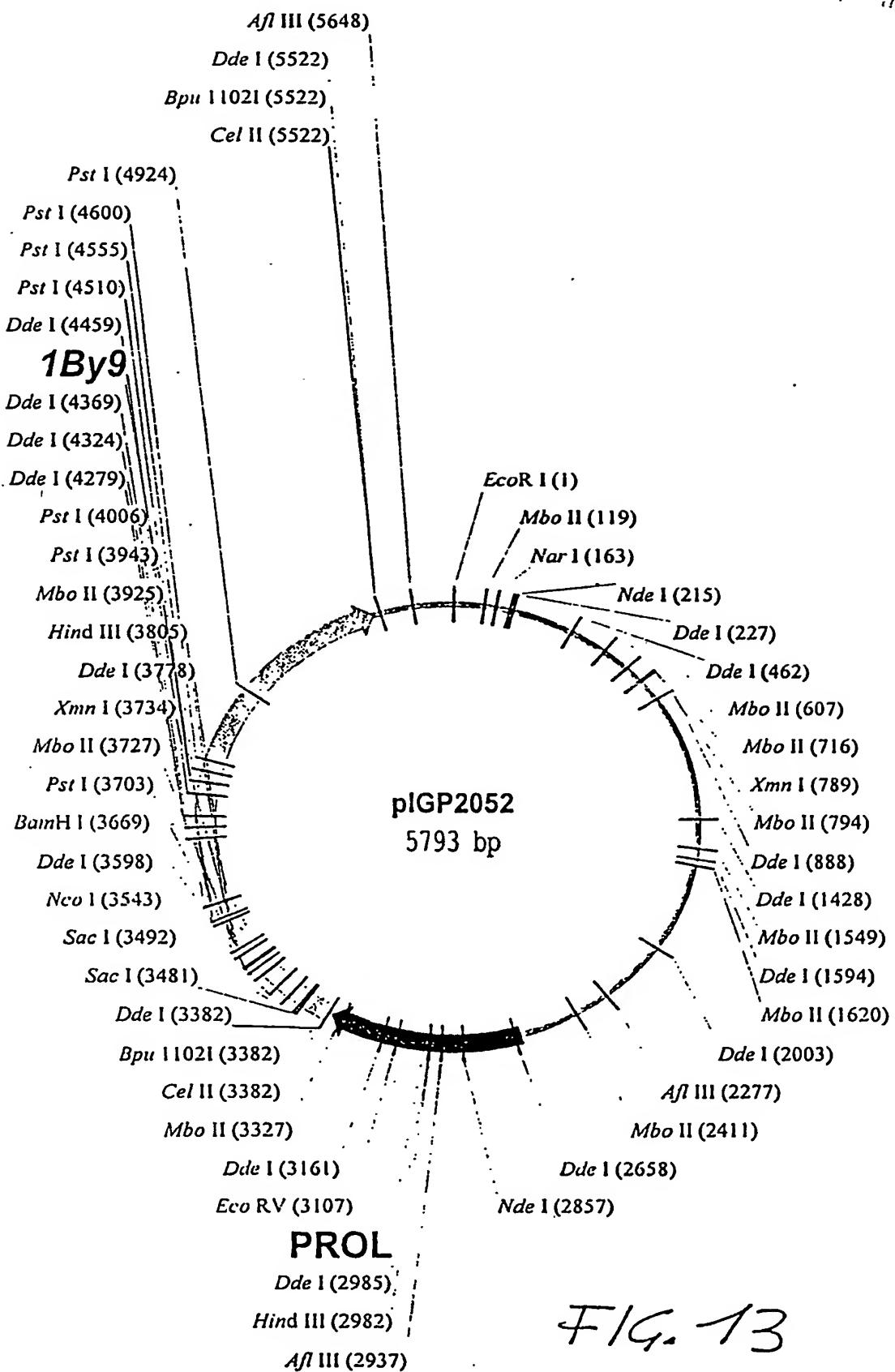
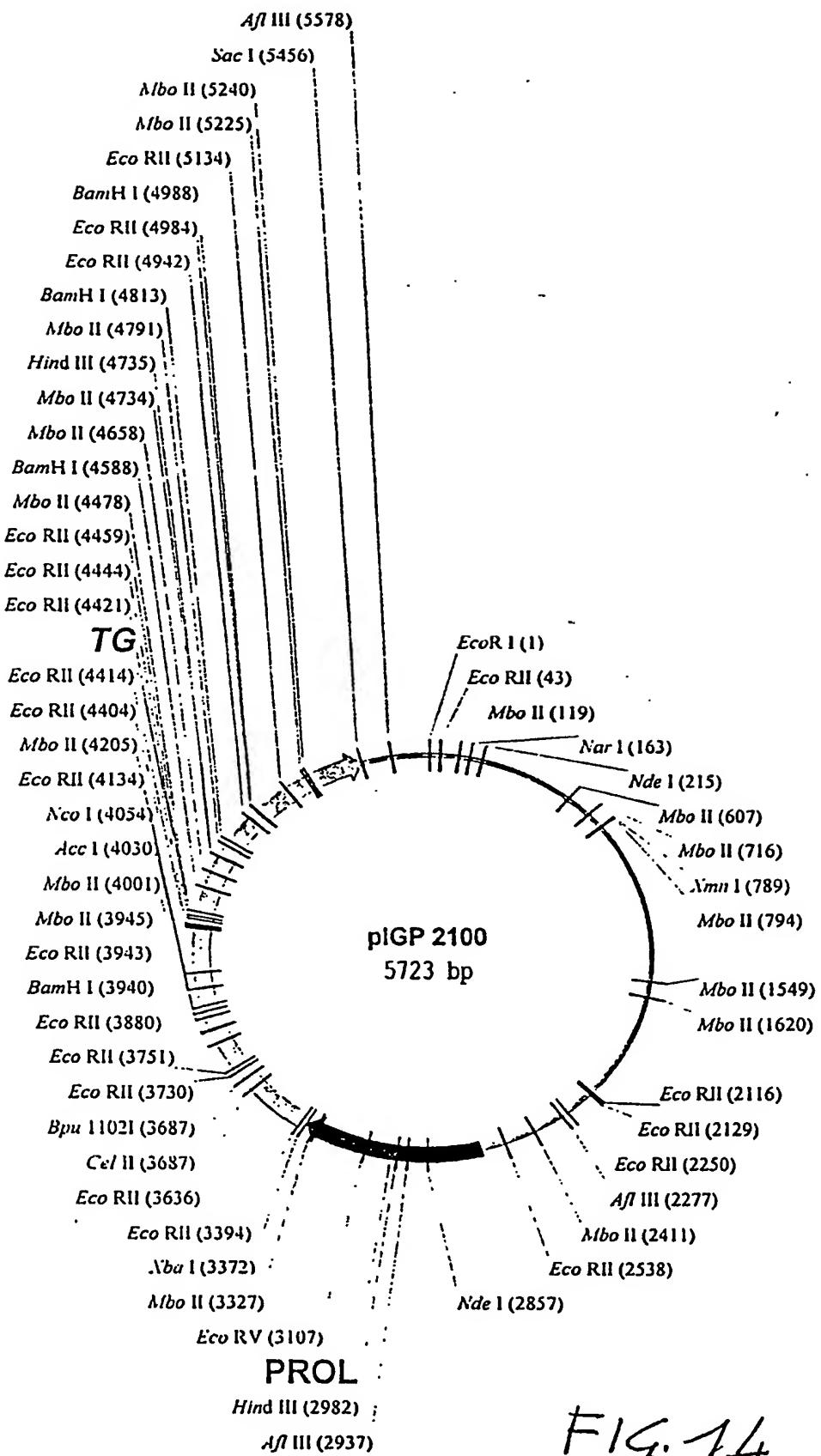


FIG. 13



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
L'EDOLINA
UFFICIO BREVETTI

B02002A 000714



CAMERÀ DI COMMERCIO E INDUSTRIA
DI GENOVA E PROVINCIA
UFFICIO BREVETTI



Figura 15. Gel di agarosio colorato con etidio bromuro e fotografato alla luce UV per evidenziare i prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando DNA estratto da foglie di linee di riso trasformate con il vettore pIGP2002 e due primer che amplificano un frammento interno al gene di circa 300 pb. M = marcatori di peso molecolare (100 bp ladder (Promega); C+ = controllo positivo (DNA plasmide); 1-16 = singole piante di riso rigenerate su terreno di selezione; 17 = controllo negativo (DNA estratto da una pianta della var. Rosa Marchetti). Le piante positive sono quelle che presentano il frammento indicato dalla freccia.



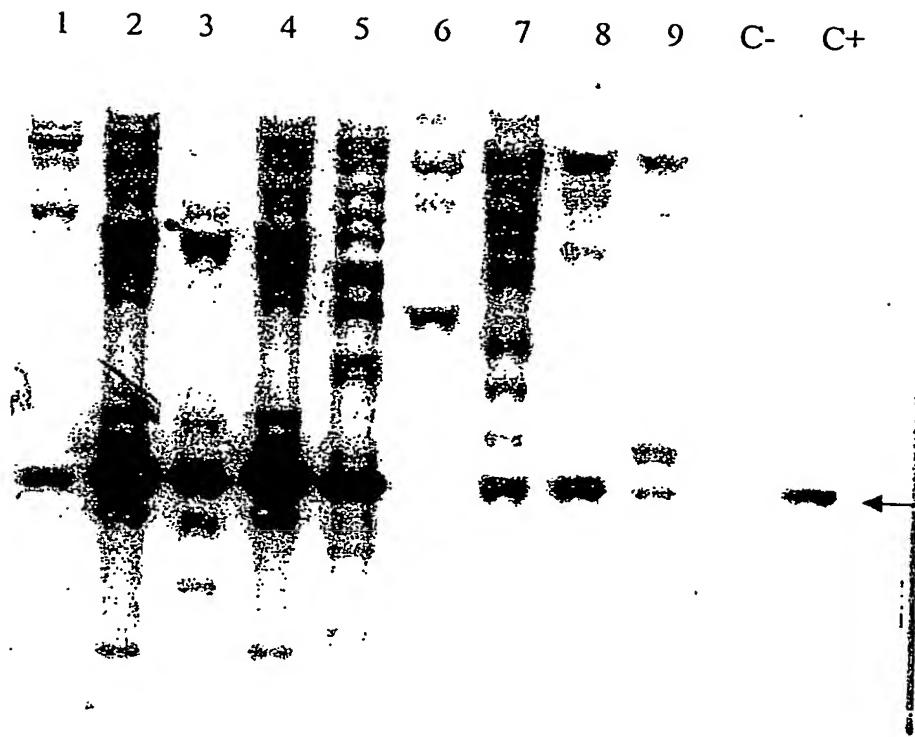


Figura 16. Analisi Southern eseguita utilizzando DNA estratto da linee transgeniche di riso positive alla PCR. Come sonda si è utilizzato un frammento del gene By9, il DNA genomico di riso è stato tagliato con due enzimi in modo da avere una indicazione del numero di copie del gene presenti in ogni linea. 1-9 = linee transgeniche di riso trasformate con il plasmide pPGI2002; C- = controllo negativo (DNA della var. Rosa Marchetti); C+ = controllo positivo.



BANCA D'ITALIA - BANCA D'ITALIA - BANCA D'ITALIA

BO200024 PGS/14

W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 C+



Figura 17. Analisi Western eseguita su proteine totali, estratte da seme di riso transgenico, dopo separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE, trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un policlonale prodotto in coniglio e specifico della proteina By9. W = proteine totali estratte da seme di frumento; 1-10 = proteine totali estratte da seme di una linea transgenica di riso in segregazione; C+ = controllo positivo (proteina By9 prodotta in *E. coli*).



200024 PGS/14

✓

B02002A 000714

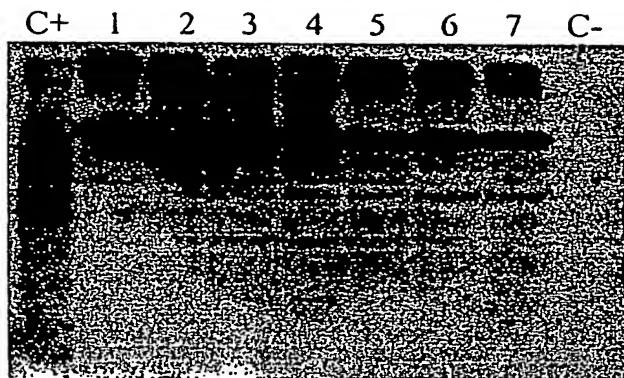


Figura 18. Analisi Western eseguita su proteine totali, estratte da seme di riso transgenico, dopo separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE, trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un policlonale prodotto in coniglio e specifico della proteina transglutaminasi (TG). 1-7 = proteine totali estratte da seme di alcune linee transgeniche di riso; C+ = controllo positivo (proteina TG prodotta in *E. coli*); C- = controllo negativo (proteine estratte dalla var. Rosa Marchetti).



CAMERÀ DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

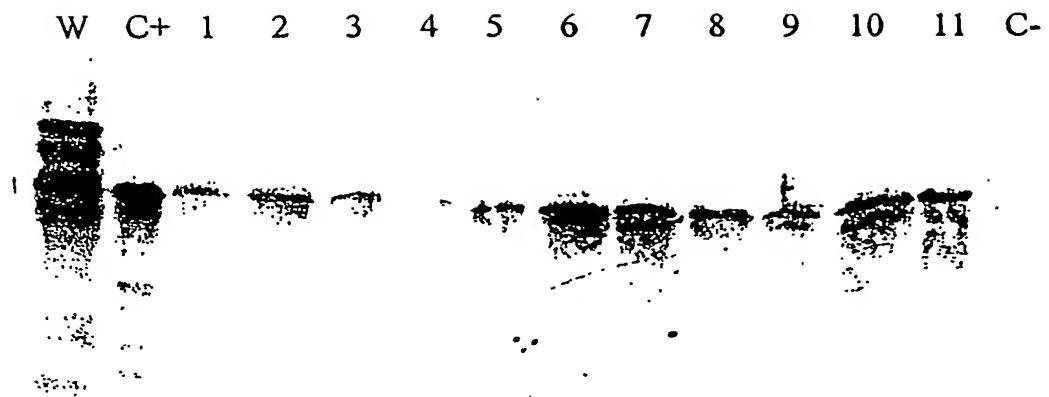


Figura 19. Analisi Western eseguita su proteine totali, estratte da seme di riso transgenico, dopo separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE, trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un policlonale prodotto in coniglio e specifico della proteina Dy10. W = proteine totali estratte da seme di frumento; 1-11 = proteine totali estratte da seme di diverse linee transgeniche di riso; C+ = controllo positivo (proteina Dy10 prodotta in *E. coli*); C- = controllo negativo (proteine estratte da seme della var. Rosa Marchetti).



CAMERÀ DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

BO2002A 0 a 6 y 14

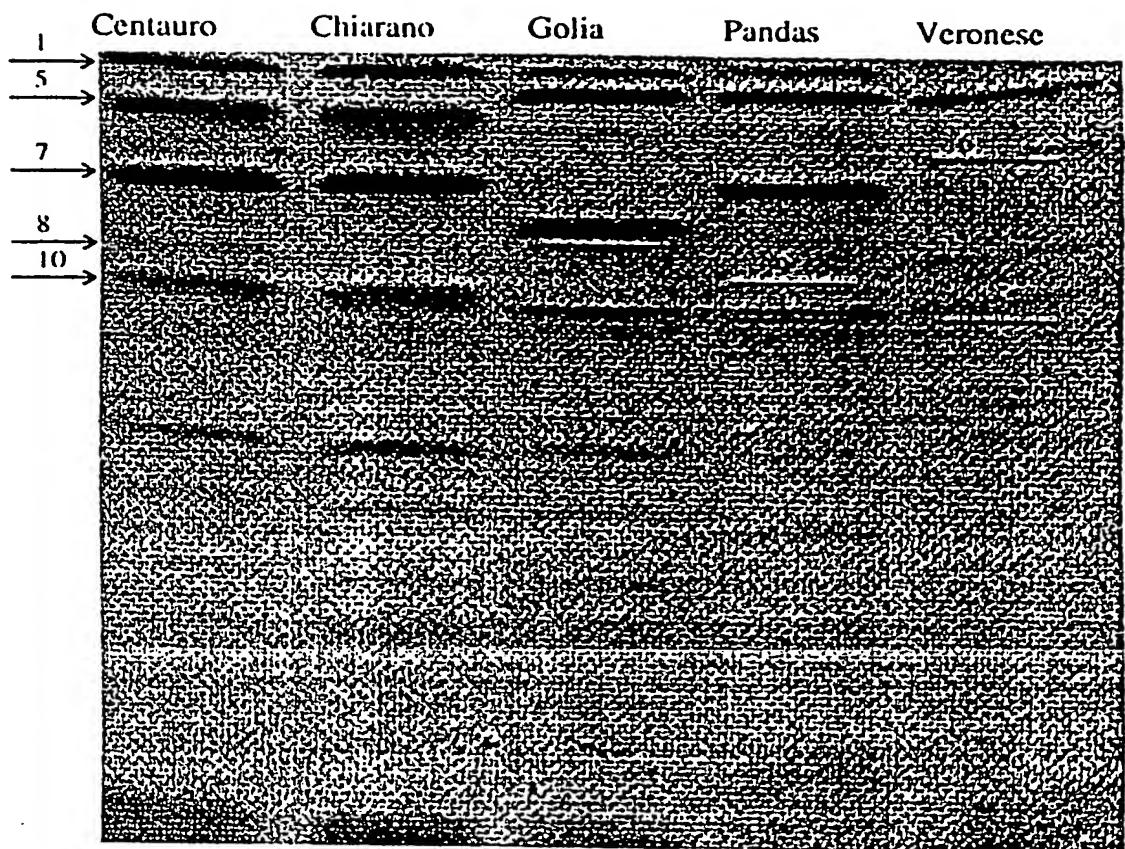
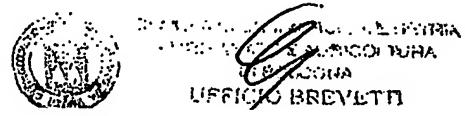
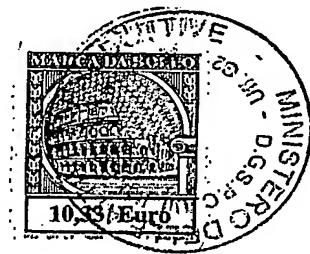


Figura 20. Colorazione con comassie blu di un gel SDS-PAGE per evidenziare le glutenine ad elevato peso molecolare presenti nelle varietà indicate e utilizzate, assieme ad altre varietà, nel lavoro di clonaggio dei singoli geni corrispondenti.



BO2002A 000714

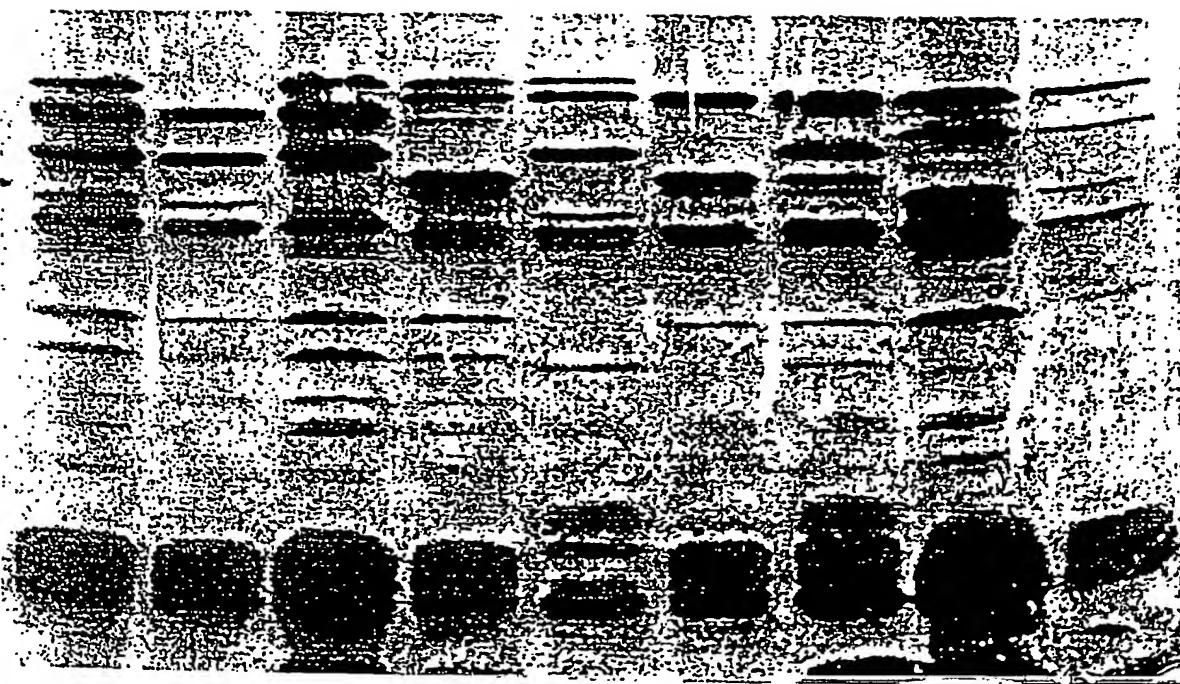


Figura 21. . Colorazione con comassie blu di un gel SDS-PAGE per evidenziare le glutenine ad elevato peso molecolare (parte alta del gel) e le glutenine a basso peso molecolare (parte bassa del gel) presenti in 9 varietà di frumento tenero.

BO2002A 000714



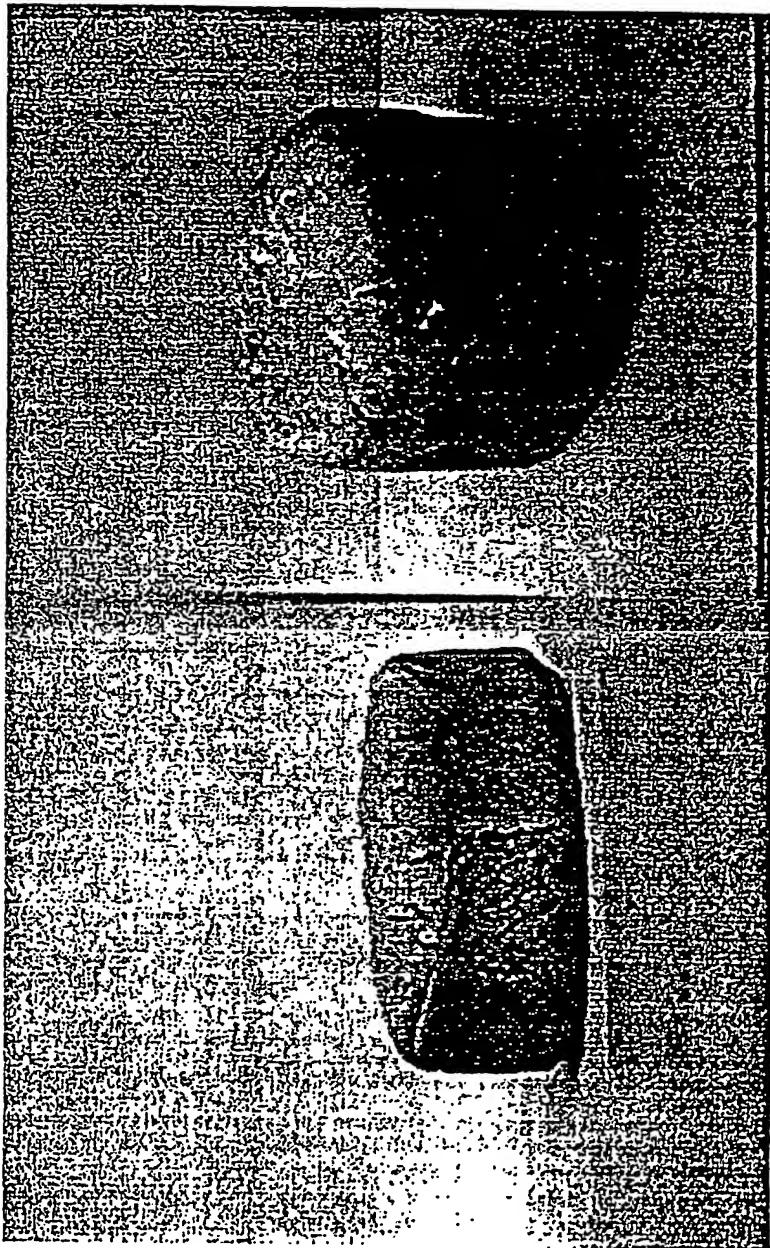
Figura 22. Analisi Western eseguita su proteine totali della figura 21 dopo trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario le IgA + IgG del siero di un paziente celiaco.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

BO2002A 000716



#16. 23



MINISTERO DELL'INDUSTRIA
EDERAZIONE E CULTURA
BREVETTI
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

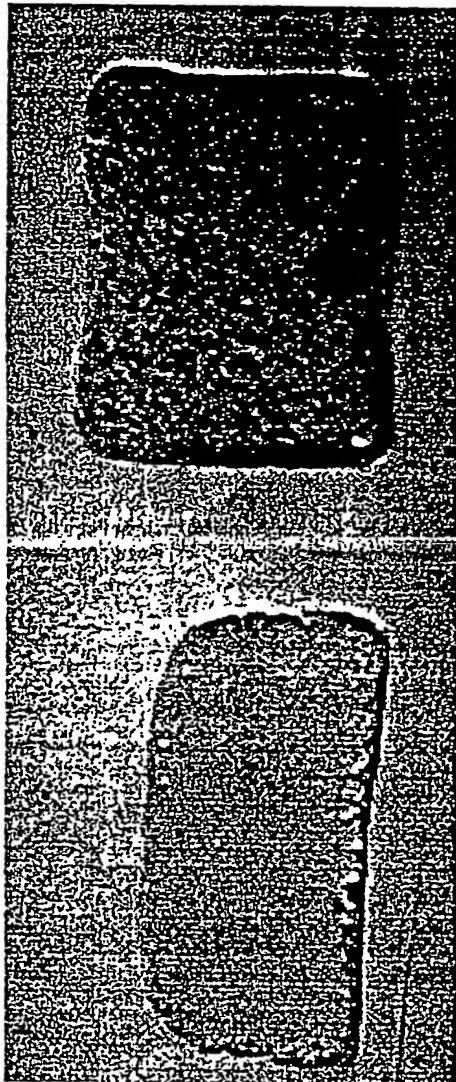


Fig. 24



10.33 Euro
MINISTERE DES POSTES
PARIS
1994

10.33 Euro
MINISTERE DES POSTES
PARIS
1994

802002A

14

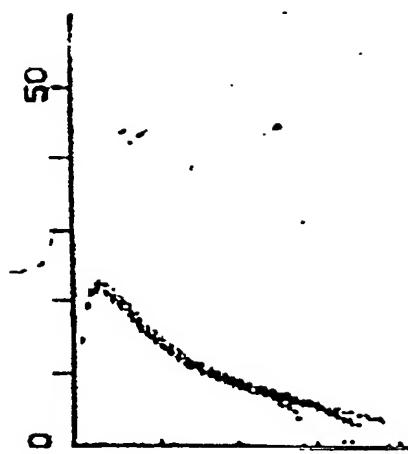


Figura 25. Risultati dell'alveogramma eseguito sull'impasto ottenuto dalla farina della tabella 5. I valori sono $P/L = 0.78 \text{ mmH}_2\text{O}/\text{mm}$ e $W = 28 \text{ E-4J}$.



CAMERA DI COMMERCIO-INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI PARMA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

BO2002A 000714

Controllo Riso PRTG

Primer IGP237 5'-TCTAGAATGGCAGAGGATCTGATCCTGGAG-3'

Primer IGP238 5'-GAGCTCTAGGCAGGGCCATGATGACG-3'

Ampl. 2070bp

Gel 0.8% - Marker 1Kb

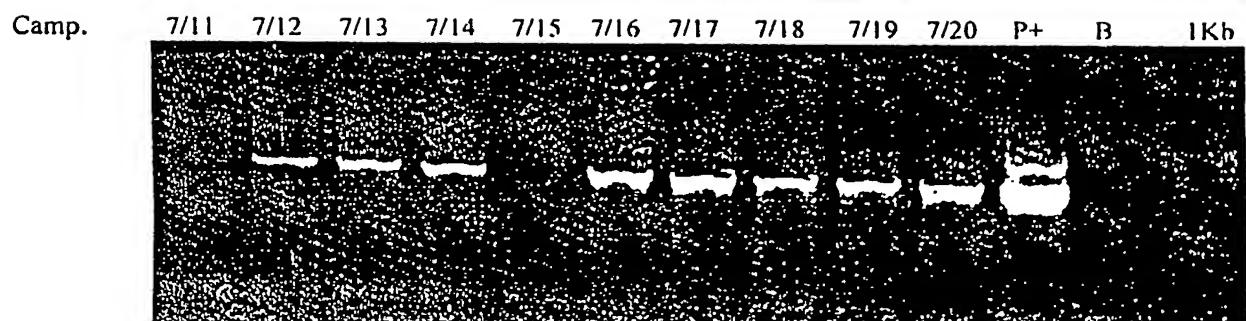
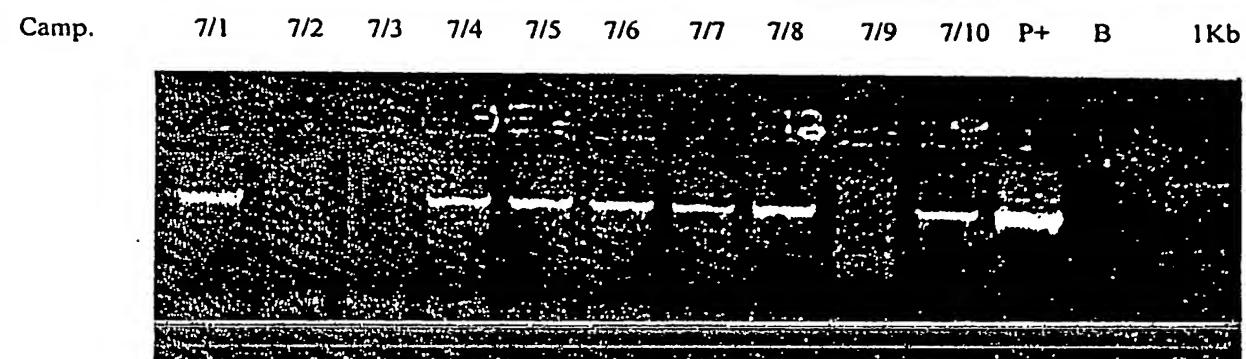
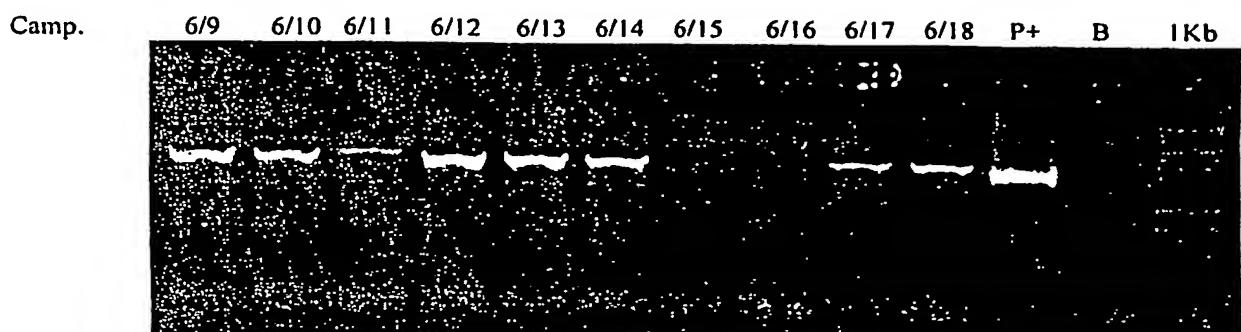


Figura 26. Gel di agarosio colorati con etidio bromuro e fotografati alla luce UV per evidenziare i prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando DNA estratto da foglie di linee di riso trasformate con il vettore pIGP2100 e due primer che amplificano il gene di circa 2070 pb. 1kb = marcatori di peso molecolare; P+ = controllo positivo (DNA plasmide); B = controllo negativo (DNA estratto da una pianta della var. Rosa Marchetti). Le piante rappresentano progenie di alcune linee trasformate.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
AGRICOLA E ARTIGLIA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI

[Handwritten signature]

	100	110	120	130
2	30	40	50	60
3	50	60	70	80
4	60	70	80	90
5	70	80	90	100
6	80	90	100	110
7	90	100	110	120
8	100	110	120	130
9	110	120	130	140
10	120	130	140	150
11	130	140	150	160
12	140	150	160	170
13	150	160	170	180
14	160	170	180	190
15	170	180	190	200
16	180	190	200	210
17	190	200	210	220
18	200	210	220	230
19	210	220	230	240
20	220	230	240	250
21	230	240	250	260
22	240	250	260	270
23	250	260	270	280
24	260	270	280	290
25	270	280	290	300
26	280	290	300	310
27	290	300	310	320
28	300	310	320	330
29	310	320	330	340
30	320	330	340	350
31	330	340	350	360
32	340	350	360	370
33	350	360	370	380
34	360	370	380	390
35	370	380	390	400
36	380	390	400	410
37	390	400	410	420
38	400	410	420	430
39	410	420	430	440
40	420	430	440	450
41	430	440	450	460
42	440	450	460	470
43	450	460	470	480
44	460	470	480	490
45	470	480	490	500
46	480	490	500	510
47	490	500	510	520
48	500	510	520	530
49	510	520	530	540
50	520	530	540	550
51	530	540	550	560
52	540	550	560	570
53	550	560	570	580
54	560	570	580	590
55	570	580	590	600
56	580	590	600	610
57	590	600	610	620
58	600	610	620	630
59	610	620	630	640
60	620	630	640	650
61	630	640	650	660
62	640	650	660	670
63	650	660	670	680
64	660	670	680	690
65	670	680	690	700
66	680	690	700	710
67	690	700	710	720
68	700	710	720	730
69	710	720	730	740
70	720	730	740	750
71	730	740	750	760
72	740	750	760	770
73	750	760	770	780
74	760	770	780	790
75	770	780	790	800
76	780	790	800	810
77	790	800	810	820
78	800	810	820	830
79	810	820	830	840
80	820	830	840	850
81	830	840	850	860
82	840	850	860	870
83	850	860	870	880
84	860	870	880	890
85	870	880	890	900
86	880	890	900	910
87	890	900	910	920
88	900	910	920	930
89	910	920	930	940
90	920	930	940	950
91	930	940	950	960
92	940	950	960	970
93	950	960	970	980
94	960	970	980	990
95	970	980	990	1000
96	980	990	1000	1010
97	990	1000	1010	1020
98	1000	1010	1020	1030
99	1010	1020	1030	1040
100	1020	1030	1040	1050
101	1030	1040	1050	1060
102	1040	1050	1060	1070
103	1050	1060	1070	1080
104	1060	1070	1080	1090
105	1070	1080	1090	1100
106	1080	1090	1100	1110
107	1090	1100	1110	1120
108	1100	1110	1120	1130
109	1110	1120	1130	1140
110	1120	1130	1140	1150
111	1130	1140	1150	1160
112	1140	1150	1160	1170
113	1150	1160	1170	1180
114	1160	1170	1180	1190
115	1170	1180	1190	1200
116	1180	1190	1200	1210
117	1190	1200	1210	1220
118	1200	1210	1220	1230
119	1210	1220	1230	1240
120	1220	1230	1240	1250
121	1230	1240	1250	1260
122	1240	1250	1260	1270
123	1250	1260	1270	1280
124	1260	1270	1280	1290
125	1270	1280	1290	1300
126	1280	1290	1300	1310
127	1290	1300	1310	1320
128	1300	1310	1320	1330
129	1310	1320	1330	1340
130	1320	1330	1340	1350
131	1330	1340	1350	1360
132	1340	1350	1360	1370
133	1350	1360	1370	1380
134	1360	1370	1380	1390
135	1370	1380	1390	1400
136	1380	1390	1400	1410
137	1390	1400	1410	1420
138	1400	1410	1420	1430
139	1410	1420	1430	1440
140	1420	1430	1440	1450
141	1430	1440	1450	1460
142	1440	1450	1460	1470
143	1450	1460	1470	1480
144	1460	1470	1480	1490
145	1470	1480	1490	1500
146	1480	1490	1500	1510
147	1490	1500	1510	1520
148	1500	1510	1520	1530
149	1510	1520	1530	1540
150	1520	1530	1540	1550
151	1530	1540	1550	1560
152	1540	1550	1560	1570
153	1550	1560	1570	1580
154	1560	1570	1580	1590
155	1570	1580	1590	1600
156	1580	1590	1600	1610
157	1590	1600	1610	1620
158	1600	1610	1620	1630
159	1610	1620	1630	1640
160	1620	1630	1640	1650
161	1630	1640	1650	1660
162	1640	1650	1660	1670
163	1650	1660	1670	1680
164	1660	1670	1680	1690
165	1670	1680	1690	1700
166	1680	1690	1700	1710
167	1690	1700	1710	1720
168	1700	1710	1720	1730
169	1710	1720	1730	1740
170	1720	1730	1740	1750
171	1730	1740	1750	1760
172	1740	1750	1760	1770
173	1750	1760	1770	1780
174	1760	1770	1780	1790
175	1770	1780	1790	1800
176	1780	1790	1800	1810
177	1790	1800	1810	1820
178	1800	1810	1820	1830
179	1810	1820	1830	1840
180	1820	1830	1840	1850
181	1830	1840	1850	1860
182	1840	1850	1860	1870
183	1850	1860	1870	1880
184	1860	1870	1880	1890
185	1870	1880	1890	1900
186	1880	1890	1900	1910
187	1890	1900	1910	1920
188	1900	1910	1920	1930
189	1910	1920	1930	1940
190	1920	1930	1940	1950
191	1930	1940	1950	1960
192	1940	1950	1960	1970
193	1950	1960	1970	1980
194	1960	1970	1980	1990
195	1970	1980	1990	2000
196	1980	1990	2000	2010
197	1990	2000	2010	2020
198	2000	2010	2020	2030
199	2010	2020	2030	2040
200	2020	2030	2040	2050
201	2030	2040	2050	2060
202	2040	2050	2060	2070
203	2050	2060	2070	2080
204	2060	2070	2080	2090
205	2070	2080	2090	2100
206	2080	2090	2100	2110
207	2090	2100	2110	2120
208	2100	2110	2120	2130
209	2110	2120	2130	2140
210	2120	2130	2140	2150
211	2130	2140	2150	2160
212	2140	2150	2160	2170
213	2150	2160	2170	2180
214	2160	2170	2180	2190
215	2170	2180	2190	2200
216	2180	2190	2200	2210
217	2190	2200	2210	2220
218	2200	2210	2220	2230
219	2210	2220	2230	2240
220	2220	2230	2240	2250
221	2230	2240	2250	2260
222	2240	2250	2260	2270
223	2250	2260	2270	2280
224	2260	2270	2280	2290
225	2270	2280	2290	2300
226	2280	2290	2300	2310
227	2290	2300	2310	2320
228	2300	2310	2320	2330
229	2310	2320	2330	2340
230	2320	2330	2340	2350
231	2330	2340	2350	2360
232	2340	2350	2360	2370
233	2350	2360	2370	2380
234	2360	2370	2380	2390
235	2370	2380	2390	2400
236	2380	2390	2400	2410
237	2390	2400	2410	2420
238	2400	2410	2420	2430
239	2410	2420	2430	2440
240	2420	2430	2440	2450
241	2430	2440	2450	2460
242	2440	2450	2460	2470
243	2450	2460	2470	2480
244	2460	2470	2480	2490
245	2470	2480	2490	2500
246	2480	2490	2500	2510
247	2490	2500	2510	2520
248	2500	2510	2520	2530
249	2510	2520	2530	2540
250	2520	2530	2540	2550
251	2530	2540	2550	2560
252	2540	2550	2560	2570
253	2550	2560	2570	2580
254	2560	2570	2580	2590
255	2570	2580	2590	2600
256	2580	2590	2600	2610
257	2590	2600	2610	2620
258	2600	2610	2620	2630
259	2610	2620	2630	2640
260	2620	2630	2640	2650
261	2630	2640	2650	2660
262	2640	2650	2660	2670
263	2650	2660	2670	2680
264				

KYRGZSTAN SVECHENKE OKEMI

תְּבִ�ָה
בְּבִזְבָּחָה
בְּבִזְבָּחָה
בְּבִזְבָּחָה

TAB. 1

1 atggcagagg atctgatcct ggagagatgt gattgcagc tggaggtcaa
 51 ggccgcgacc accgcacggc cgacctgtgc cgggagaggc tgggtgtcg
 101 gcggggccag cccttctggc tgacgctgca ctttggggc cgtggctacg
 151 aggctgggt ggacacttc acettcaacg ctgtgaccgg cccagatccc
 201 agtgaggagg cccggactat ggcccggttc tcactgtcca gtgctgtcga
 251 gggggcacc tggtcagcct cagcagtggc ccagcaggac agcactgtct
 301 cgctgtct cagcacccca gctgatgccc ccattggct gtatgcctc
 351 agcctggagg cttccactgg ttaccaggc tccagcttcg tactggcca
 401 cttcatcctg ctctacaatc ctccgtgccc agcggatgtc gtctatatgg
 451 actcagacca agagcggcag gagatgtgc tcacccaaca gggcttcata
 501 taccagggtc cggccaagtt catcaatggc ataccttggc acttcgggca
 551 gtttgaagat gggatcctgg atatttgcct gatgctttg gacaccaacc
 601 ccaagttcct gaagaatgtc ggccaagact gtcgcgccc cagcagact
 651 gtctacgtgg gcccgggtt gaggcgcatt gtcactgtca atgacgatca
 701 gggcgtgctt cagggacgtc gggacaacaa ctacagtgtat ggtgtcagcc
 751 ccatgtcctg gatccggcagc gtggacatcc tgcggcgctg gaaagactat
 801 gggtggcagc gctcaagta cggccagtgc tgggtcttcg ctgctgtggc
 851 ctgcacagtg ctgcggtgcc ttggcatccc caccggatc gtgaccact
 901 ttaactcagc ccacgaccag aacagcaacc tgctcatcga gtacttccga
 951 aacgagtctg gggagatcga gggaaacaag agcagatgtc tctggaaactt
 1001 ccactgctgg gtggagtctg ggtgaccag gccggacctg gagcctgggt
 1051 acgaggggtg gcaggccctg gaccccacac cccaggagaa gagtgaaggg
 1101 acatactgtc gtggccctagt tccggttcga gccatcaagg agggccaccc
 1151 gaacgtcaag tatgtatgcac ctttcgtgtt tgctgaggc aatgctgacg
 1201 tggtaactg gatccggcag aaagatgggt ccctgcgcaa gtccatcaac
 1251 catttggttg tggggctgaa gatcgtact aagagtgtgg gccgcgatga
 1301 gcgagaggac atcacccaca cctacaagta cccagggaa tctgaagagg
 1351 agcggaaagc ttttggtagg gccaaccacc taaataaaact gcccacaaag
 1401 gaagaggctc aggagggaaac gggagtggcc atgcggatcc gtgtgggcca
 1451 gaacatgact atggcagtg acttgcacat ctttgcctac atcaccaatg
 1501 gcaactgtga gagccacgaa tgccaaactcc tgctctgtgc aegcatacg
 1551 agctacaatg gatccctggg gcccgtgtgc agcacaacg acctgtctaa
 1601 cctgaccctg gatcccttc cggagaacag cttccctg cccatccct
 1651 atgagaagta cgggtgactac ctgactgtgact ccaacccatc caaggtgg
 1701 ggccttccta tcgagccagc agccaaacgc tatgtattgg ccgagaggaa
 1751 catttacctg gagaatccag aaatcaagat cccggctttt ggggagccca
 1801 agcagaaccc caagctgatt gctgagggtt ctctgtaaagaa tccgctccct
 1851 gtggcgtgc tgggtgtat cttcaccgtg gaaggagctg gcctgaccaa
 1901 ggaccagaag tcgggtggagg tcccgacccc cgtggaaagca ggggagcaag
 1951 cgaaggtacg ggtggacccctg ctggccgacgg aggtggccct ccacaagctg
 2001 gtggtaact tcgagtgca caagctgaag gccgtgaagg gctatcgaa
 2051 cgtcatcatac gccccgcct aa

Tabella 2. Sequenza nucleotidica del gene che codifica per la transglutaminasi di criceto da noi clonato a partire da mRNA di fegato e sequenziato. Le basi sottolineate indicano il codone di inizio e di stop.



CAMERÀ DI COMMERCIO INDUSTRIA
 ARTIGIANATO AGRICOLTURA
 TURISMO
 UFFICIO BREVETTI
 II. RINNOVAMENTO

Acl
 Apal
 Asp700
 XmnI
 EcoRI

1 GAATTCCTTC TACATCGGCT TAGGTGTAAC AACACGACTT TATTATTATT
CTTAAGGAAG ATGTAGCCGA ATCCACATCG TTGTGCTGAA ATAATAATAA

51 ATTATTATTAA TTATTATTAT TTTACAAAAA TATAAAATAG ATCAGTCCCT
TAATAATAAT AATAATAATA AAATGTTTT ATATTTATC TAGTCAGGGA

101 CACCACAAGT AGAGCAAGTT GGTGAGTTAT TGTAAGTTC TACAAAGCTA
GTGGTGTCA TCTCGTCAA CCACTCAATA ACATTTCAAG ATGTTTCGAT

DraI

151 ATTAAAAGT TATTGCATTA ACTTATTTCA TATTACAAAC AAGAGTGTCA
TAAATTTCA ATAACGTAAT TGAATAAAAGT ATAATGTTG TTCTCACAGT

Ndel

201 ATGGAACAAT GAAAACCATA TGACATACTA TAATTTGTT TTTATTATTG
TACCTTGTAA CTTTGGTAT ACTGTATGAT ATAAAACAA AAATAATAAAC

251 AAATTATATA ATTCAAAGAG AATAAATCCA CATAGCCGTA AAGTTCTACA
TTTAATATAT TAAGTTCTC TTATTTAGGT GTATCGGCAT TTCAAGATGT

301 TGTGGTGCAT TACCAAAATA TATATAGCTT ACAAAACATG ACAAGCTTAG
ACACCACGTA ATGGTTTTAT ATATATCGAA TGTTTGTAC TGTCGAATC

351 TTTGAAAAAT TGCAATCCCTT ATCACATTGA CACATAAAAGT GAGTGATGAG
AAACTTTTA ACGTTAGGAA TAGTGTAACT GTGTATTTCA CTCACTACTC

401 TCATAATATT ATTTCTTG CTACCCATCA TGTATATATG ATAGCCACAA
AGTATTATAA TAAAAGAAC GATGGTAGT ACATATATAC TATCGGTGTT

Alw44I

AspHII

BmyI

BglII

Bsp1286I

HgiAI

SnaI

Apal

MadII

EcoRV

451 AGTTACTTTG ATGATGATAT CAAAGAACAT TTTAGGTGC ACCTAACAGA
TCAATGAAAC TACTACTATA GTTCTTGTA AAAATCCACG TGGATTGTCT

501 ATATCCAAAT AATATGACTC ACTTAGATCA TAATAGAGCA TCAAGTAAAA
TATAGTTTA TTATACTGAG TGAATCTAGT ATTATCTCGT AGTCATTTT

551 CTAACACTCT AAAGCAACCG ATGGGAAAGC ATCTATAAT AGACAAGCAC
GATTGTGAGA TTTCGTTGGC TACCCCTTCG TAGATATTTA TCTGTTGTG

FokI

601 AATGAAAATC CTCATCATCC TTCACCACAA TTCAAATATT ATAGTTGAAG
TTACTTTAG GAGTAGTAGG AAGTGGTGT AAGTTATAA TATCAACTTC

Tfl

HpaII

651 CATAGTAGTA GAATCCAACA ACAATGAAGA TCATTTCGT ATTTGCTCTC
GTATCATCAT CTTAGGGTGT TGTTACTTCT AGTAAAAGCA TAAACGAGAG

BstBI

HpaI

MacI

BglI

701 CTTGCTATTG TTGCATGCAA TGCCTCTGCG TCTAGA
GAACGATAAC AACGTACGTT ACGGAGACGC AGATCT

TAB 3



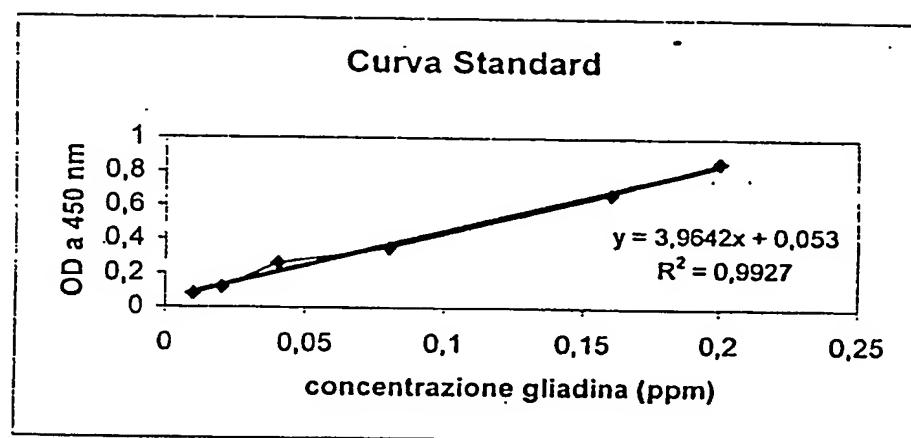
BO200000000714

Nome Gene	Acces. Number	Primer senso Primer antisenso	Siti di clonaggio (5'-3')	Dimens. Amplif.
1Ax1	X61009	PLT217-GCTCAGCAGAGTTCTATCACTGGCTGGCCAAC PLT219-GGATCCGATTAACGTGGCTTACGCAGACCGTC	BamHI-PstI	2.783
1Ax2	M22208	PLT228-GGATCCGCTTAGAACATTGAGTGGCCGC PLT230-GCTCAGCCTATCACTGGCTGGCCAACAATGC	BamHI-CelII	2.910
1Bx7	M22209	PLT185-TCTAGAACATGGCACTACTCCACATGGTTAG PLT186-CACCATGCAAGCTGCAGAGAG	XbaI-PstI	2.853
1Bx17	JC2099	PLT562-TCTAGATATGGCTAACGGGTTAGTCCTC PLT563-GATATCTGGAGCTGCAGAGAGATTC	XbaI-SacI	2.259
1By9	X61026	PLT272-CCCGGGCACAGATAATGTTGTGATTCA PLT273-GTCGACTGCAAGTTGCAGAGAGTTCTAT	XbaI-SalI	2.771
1Dx5	X12928	G1B5-TGTTCCATGCAGGCTACCTCCCACTAC PLT189-GTCGACATGCCAACGACCATGCGAG	EcoRI-SalI	3.033
1Dy10	X12929	G2B3-AAGCTTTCATTTGCATTATTATTGGGTT G2B5-ACCTTATCCATGCAAGCTACCTCCAC	EcoRI-EcoRI	2.555
1Dy12	X03041	PLT482-GAATTCCGAGATTGCAAAAGCAATGGCTAAC PLT483-TCTAGAGCTTGAGAAAGGGTAATCATCAGTG	EcoRI-PstI	3.035
HMW2	X03346	PLT488-GAATTCAAGCTTGAGTGGCCGTAGATTGCA PLT489-GGATCCATATAGGATCTGTCCTCATGGCTG	EcoRI-BamHI	3.179
GlulA	X03042	PLT571-TCTAGATGGCTAACGGGGTTGGCTCTC PLT572-GATATCGCTCTTGTGCAATTCAACACTCTTAC	BamHI-SalI	2.895
TG	M19646	PLT237-TCTAGAACATGCCAGAGGATCTGATCCTGGAG PLT238-GAGCTCTAGGGGGGGGGGATGATGACG	XbaI-SacI	2.072

Tabella 4

BO2002A 000714

campione	ppm	OD 450 nm
controllo negativo	0	0,12
STND	0,01	0,08
STND	0,02	0,12
STND	0,04	0,26
STND	0,08	0,35
STND	0,16	0,67
STND	0,2	0,86



campione	OD 450 nm	ppm	diluizione	% glutine
Farina di riso (Reference)	0,13	0,019	1/500	0,002
Nuova Farina	0,15	0,024	1/500	0,002
Farina di frumento	0,49	0,110	1/500000	11,024

$$\% \text{ glutine} = \text{OD}(450) \times F \times 2$$

F= Fattore di diluizione

2= Fattore di conversione per il glutine totale

Pesata iniziale del campione 5g

TAB. 5



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
ROMA
DIREZIONE DI RICERCHE
DI GIGLIOLINA
UNIVERSITÀ DI ROMA
N. FRANCIA
R. FRANCIA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.